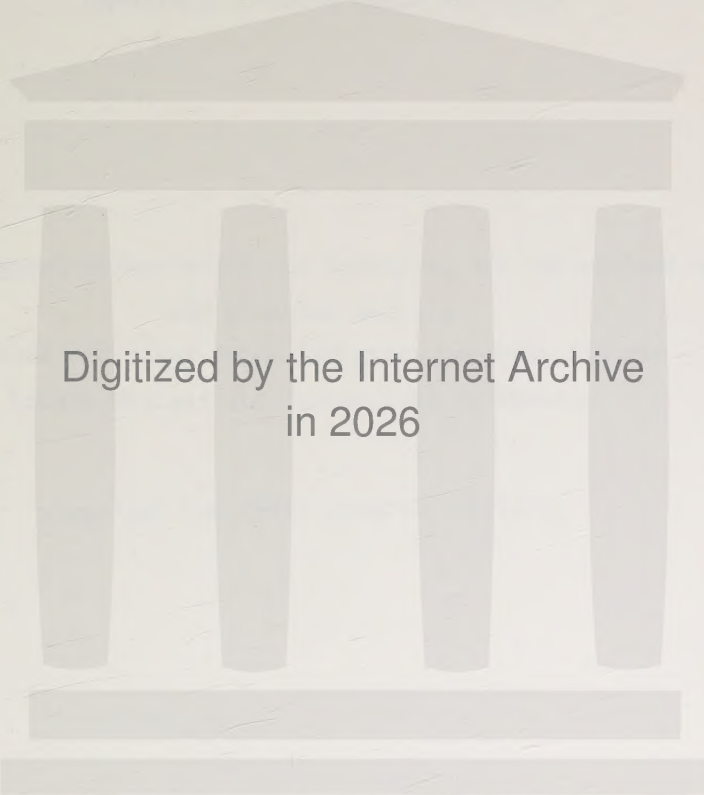


HÄMOSTASEOLOGISCHE KOLLAGENSTUDIEN

Fritz Schulte

—

1974



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551921_0002

DISSERTATIONS- UND FOTODRUCK FRANK oHG
8 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2 8 0 9 0 9 0

Aus der I. Medizinischen Klinik der Universität München
Direktor: Professor Dr. H. Schwiegk

HÄMOSTASEOLOGISCHE KOLLAGENSTUDIEN

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde in
der gesamten Medizin
verfasst und einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von Fritz Schulte, Freising

München 1973



Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München

Berichterstatter: Prof.Dr.med.R.Marx

Dekan: Prof.Dr.med.W.Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 5.2.1974

I n h a l t

	Seite
1. Einleitung	1
1.1. Die Bedeutung des Kollagens für die Hämostase	
1.2. Zum Vorkommen des Kollagens im Organismus	2
1.3. Aufbau und Strukturen des Kollagens	3
1.4. Die hämostatisch aktiven Gruppen und Strukturen des Kollagens	8
1.5. Die Stellung der kollageninduzierten Schritte und deren Störung im Ablauf der Hämostase	9
1.6. Folgerungen für Hämostaseologie, Klinik und Kollagenforschung	13
2. Material und Methoden	14
2.1. Die Kollagenpräparationen	
2.2. Verwendete Substanzen und Reagentien	16
2.3. Präparation des Blutes und der Blutplättchen	17
2.4. Angewendete Tests bzw. Untersuchungsmethoden und deren Durchführung	18
2.4.1. Plättchenzählung, mikroskopische Beobachtung und Dokumentation verschiedener Plättchenleistungen	
2.4.2. Turbidimetrische Messung der Plättchenadhäsion, -sphärisierung und -aggregation nach Born	19
2.4.3. Messung der Plättchenaggregation im zitratisierten Vollblut mit dem Kollagen-Zentrifugiertest nach Marx und Schulte	23
2.4.4. Retraktion von PRP nach Marx und Murr	26
2.4.5. Untersuchung der Faktor-XII-Aktivierung	27
3. Experimentelle Ergebnisse	28
3.1. Voruntersuchungen zu den verwendeten Plättchenaggregationstesten	
3.1.1. Abhängigkeit des Kollagen-Zentrifugiertests von der Verarbeitungsdauer des Zitratblutes	
3.1.2. Reproduzierbarkeit des Kollagen-Zentrifugiertests	29

3.1.3.	Der Kollagen-Zentrifugiertest mit lipämischem Blut - Die Abhängigkeit des Tests von der Plättchenzahl	33
3.1.4.	Normalbereich der Plättchenaggregation im Kollagen-Zentrifugiertest	35
3.1.5.	Einfluss von Heparin, "Calciparin" und Natrium-Zitrat auf die Plättchenaggregation im PRP	37
3.1.6.	Abhängigkeit der Plättchenaggregation im PRP von der Plättchenzahl und der Ca^{++} -Konzentration	42
3.1.7.	Aggregation gewaschener Plättchen im Born-Apparat	44
3.1.8.	Einfluss der Plättchenalterung und des Verdünnungsmediums auf die Thrombozytenaggregation im Born-Aggregometer	45
3.2.	Die Aggregation von Blutplättchen im PRP durch unterschiedliche Aggregantien: Kollagenfibrillen - Adrenalin - ADP - "Cialit"	50
3.3.	Die Wirksamkeit unterschiedlicher Kollagenpräparationen auf Blutplättchen im PRP	61
3.3.1.	Die plättchenaggregierende Wirksamkeit suspendierter Kollagene	63
3.3.2.	Die plättchenaggregierende Wirksamkeit gelöster Kollagene	65
3.3.3.	Die Phasen der Reaktion von Blutplättchen mit sauer-suspendierten Kollagenfibrillen (SSKF) im PRP	67
3.3.4.	Die plättchenaggregierende Wirksamkeit modifizierter SSKF im PRP - Die Lagerungsstabilität der SSKF	68
3.3.5.	Die Wirkung von BrCN-Peptiden des Kollagens auf die Plättchenaggregation	79
3.4.	Die Verwendbarkeit verschiedener Kollagenpräparationen bei der in-vitro-Testung unterschiedlicher Aggregationshemmer	
3.5.	Die Verwendung sauersuspendierter Kollagenfibrillen (SSKF) zur Testung der Plättchenadhäsion und -aggregation im Kollagen-Zentrifugiertest und im Born-Aggregometer	89
3.5.1.	Vergleichende Untersuchung der Plättchenaggregabilität im zitratisierten Vollblut und im PRP vor und nach einer Azetylsalicylsäure-Behandlung	90
3.5.2.	Messung der Plättchenaggregation mit SSKF bei einigen Patienten während einer ASS-(<i>"Colfarit"</i>)-Bhdlg.	99
3.5.3.	Die Plättchenaggregabilität bei einigen Patienten mit einer Thrombopathifikantien-positiven Anamnese	104

	Seite
3.5.4. Untersuchung der Plättchenaggregation bei einigen Patienten mit schwer verlaufenen, akuten Erkrankungen und bei einigen Patienten mit unklarer Blutungsanamnese	109
3.5.5. Aggregationsverhalten der Blutplättchen von je drei Patienten mit Thrombastenie und mit Thrombozythämie - Kollagen-Zentrifugiertest bei drei Geschwistern mit M.v.Willebrand-Jürgens	115
3.6. Die retraktionsstimulierende Wirkung sauersuspenderter Kollagenfibrillen (SSKF) auf Thrombozyten	124
3.7. Aktivierung des Faktors-XII der Blutgerinnung mit Hilfe von Kollagen	127
4. Diskussion	130
4.1. Die Turbidimetrie der Thrombozytenaggregation im PRP	130
4.2.1. Unterschiedliche Kollagenpräparationen für die Aggregation von Blutplättchen im PRP	135
4.2.2. Die Wirkung verschieden präparierten Kollagens auf die Thrombozytenaggregation im PRP	142
4.3. Kollagen und andere Aggregantien	146
4.4. Die Messung der Thrombozytenaggregation im Vollblut (Der Kollagen-Zentrifugiertest)	153
4.5. Die kollageninduzierte Aggregation thrombopathifizierter Blutplättchen	158
5. Zusammenfassung	163
6. Literatur	165

1. E i n l e i t u n g

Der Begriff der Hämostase beinhaltet alle physiologischen Vorgänge, die in äusserst komplexer Weise eine Blutung traumatisch oder durch Krankheit alterierten Gewebes stillen. Neben einer Veränderung der Hämodynamik und weiteren gefässspezifischen Faktoren, zählen hierzu besonders die Leistungen der Blutplättchen im Zusammenhang mit der Funktion plasmatischer Faktoren der Blutgerinnung (78). Verläuft die Hämostase in pathophysiologischem Sinn, so kann dies zur Ursache etwa von Blutungsübeln, Thrombosen oder auch generalisierten, intravasalen Gerinnungsvorgängen und deren Folgen werden.

Bordet und Gengou (10) erkannten 1903 die Bedeutung der "Fremden Oberfläche" für die Aktivierung der an das Blut gebundenen Faktoren der Hämostase. Sie beobachteten, dass Blut im direkten Kontakt mit einer Glasoberfläche viel schneller gerinnt, als nach einer vorangegangenen Paraffinierung derselben.

In der folgenden Zeit liess sich freilich lange kein Substrat ausmachen, welches in vivo für derartige kontaktaktivierte Schritte der Hämostase entscheidend war.

1.1. Die Bedeutung des Kollagens für die Hämostase

Bei vitalmikroskopischen Untersuchungen an mesenterialen Gefässen von Ratten sahen Bounameaux (1959) und Hugues (1960) in den ersten zwei bis drei Sekunden nach einer Traumatisierung das Adhärieren erster herangespülter Blutplättchen an freigelegten subendothelialen Fibrillen (152). Durch Anlage-

rung weiterer, hinzukommender Plättchen imponierten zunächst lockere, bienenschwarmartige Aggregate.

Die folgenden Untersuchungen (^{16,53}) auch anderer Arbeitsgruppen (^{128, 54, 112, 48}) unterstützten die Annahme der Erstuntersucher, es handle sich bei dem für die Adhäsion und Aggregation der Thrombozyten spezifischen Substrat des Bindegewebes um Kollagen. Während Hovig (⁴⁸) dies elektronenmikroskopisch nachweisen konnte, vermissten Spät und Erichson (¹¹⁴) eine ähnliche Reaktion der Plättchen mit anderen physiologischen Substraten wie Elastin und Endothelzellen.

Als körperfremde Substanzen deren Oberfläche den Faktor XII (Hageman-Faktor) und den Faktor XI (PTA-, i.e. Plasma-Thromboplastin-Antecedent-Faktor) der Blutgerinnung zu aktivieren vermag, fand man u.a. Glas (⁸), Asbest (⁵⁹), Bariumkarbonat, Holzkohle, Kaolin (¹⁰¹), Zelit (¹¹⁹), Bentonit (¹¹¹), Carboxymethylzellulose, Aluminiumoxyd (⁷⁷), Ellagsäure (¹⁰²).

Auf der Suche nach körpereigenen Aktivatoren dieser Gerinnungsfaktoren XII und XI stiess man auf Natriumsalze einiger langer, ungesättigter Fettsäuren wie dem Stearat (⁷⁶) sowie auf die Harnsäure (⁶²). 1964 entdeckten dann Niewiarowski und Mitarbeiter, dass Kollagen neben seiner Wirkung auf die Blutplättchen auch den Hageman-Faktor zu aktivieren vermag (^{85,86}). Wilner und seine Gruppe haben dies in einer differenzierten Untersuchung bestätigt (¹²⁴).

1.2. Zum Vorkommen des Kollagens im Organismus

Das faserförmige Skleroprotein Kollagen findet sich als verhältnismässig wenig speziesspezifischer Bestandteil der Extra-

oder Interzellulärsubstanz im Bindegewebe fast jeder Tierklasse (105). Jene besteht aus der sogenannten Grundsubstanz (ungeformte Interzellulärsubstanz) und der geformten Interzellulärsubstanz (Faserproteine). Zu ihnen zählen das fibrilläre Kollagen, ferner retikuläre Fasern und das Elastin. Sie alle liegen eingebettet in der Grundsubstanz aus sauren Mukopolysacchariden, Proteinpolysacchariden (Proteoglykane), Glykoproteinen und der interstitiellen Flüssigkeit, welche ihrerseits Plasmaproteine, freie Elektrolyte, Aminosäuren, Zucker, Peptide etc. enthält.

Die molekularbiologischen Zusammenhänge sowohl der Struktur als auch der Funktion jener bindegewebsspezifischen Makromoleküle im Verband der Interzellulärsubstanz sind zum Teil noch recht unklar. Im übrigen wechselt deren quantitative und qualitative Zusammensetzung sehr mit dem Typ des vorliegenden Bindegewebes.

Achillessehnen enthalten z.B., in Abhängigkeit von der Säugerart bis zu 93% Kollagen (84), Aorten 15-25% (28). Als wichtigstes Gerüstmaterial für die Gewebe der Vertebraten, beträgt der Kollagenanteil am gesamten Körpereiwiss bei den Säugern 25-30%. Damit ist Kollagen das am reichlichsten vertretene Einzelprotein, dessen Anteil am Gesamtgewicht des Säugerorganismus ungefähr 6% beträgt (41). Zahlreiche neuere Arbeiten zur Molekularbiologie und Chemie der Interzellulärsubstanz einschliesslich des Kollagens finden sich bei Balasz (5).

1.3. Aufbau und Strukturen des Kollagens

Die Kollagenfaser, die in Durchmessern von 10 (Haut) bis 200 μ

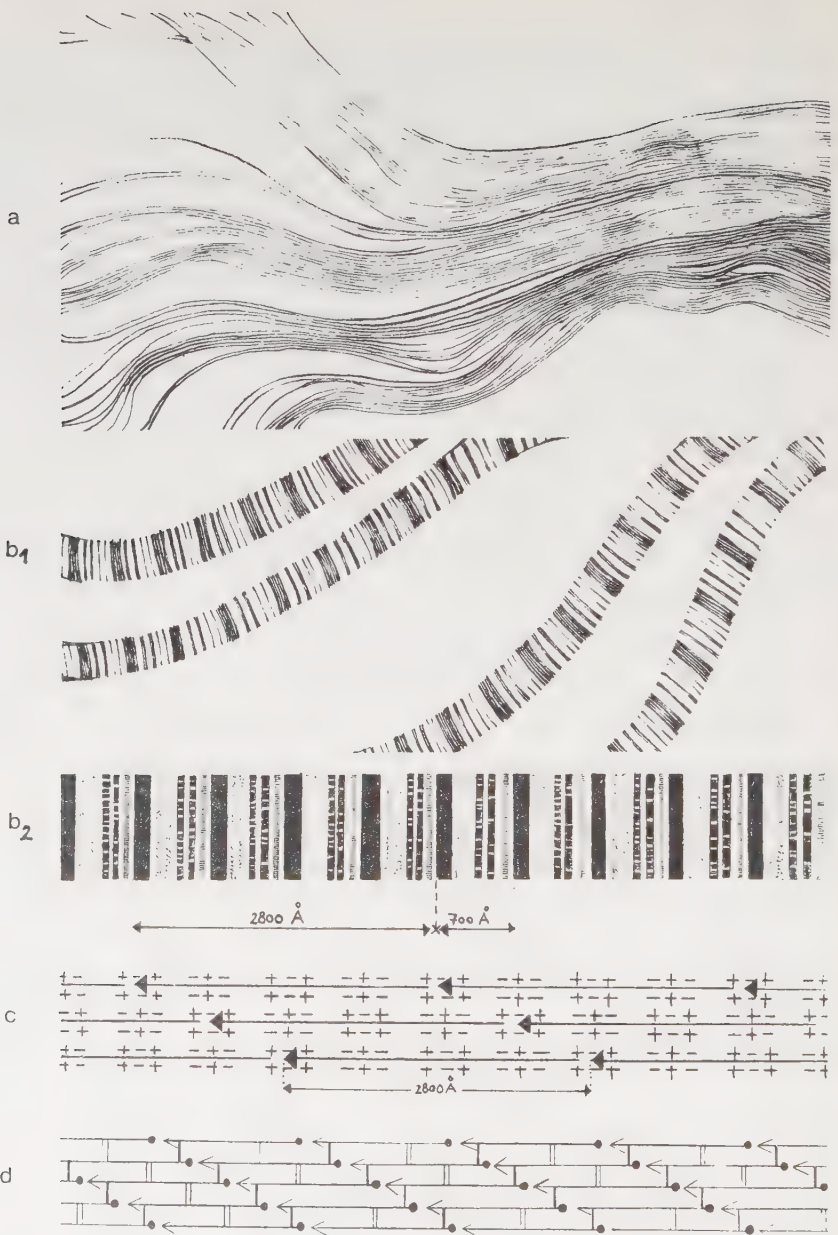


Abb.1: Aufbau der Kollagenfaser aus Bündeln kollagener Fibrillen (a) - Das spezifische Querstreifungsmuster der kontrastierten Kollagenfibrille (b) - Ladungsmuster (c) und Anordnung der einzelnen quervernetzten Kollagenmoleküle zur Fibrille (d); (grob schematisch).

(Sehnen) vorkommt, ist aus mehr oder weniger zahlreichen Bündeln kollagener Fibrillen aufgebaut (Abb.1a). Sie lassen sich durch Behandlung mit schwachen organischen Säuren wie Essig-, Ameisen-, Milch- oder Zitronensäure, ferner durch Einwirkung von Alkalien wie Kalk- oder Barytwasser isolieren. Die Dicke dieser Kollagenfibrillen liegt mit $0,5-0,2\mu$ an der Auflösungsgrenze des Lichtmikroskops, kann sie aber mit $0,02-0,03\mu$ noch erheblich unterschreiten (42).

Elektronenmikroskopische Bilder der mit Phosphorwolframsäure, Chrom-III- oder Uranylsalzen kontrastierten Fibrillen zeigen ein spezifisches, asymmetrisches Muster von 10-12 Querstreifen in Perioden von ca. 700Å (Abb.1b). Dabei entsprechen die dunklen Streifen polaren, die hellen Streifen apolaren Bereichen im Ladungsmuster (66) der Kollagenfibrille (Abb.1c).

Der Baustein der unlöslichen Kollagenfibrille ist das in Lösungen von Neutralsalzen und verdünnten Säuren lösliche, monomere Kollagenmolekül („Tropokollagen-Molekül“). Mit dem Molekulargewicht 300.000 ist es etwa $2800\text{\AA}$ lang bei einer Stärke von ca. $14\text{\AA}$ und einem annähernd steifen Stäbchen vergleichbar. Intermolekulare, kovalente Bindungen vernetzen diese Kollagenmonomeren längs und seitlich zu ihrer Quartärstruktur: fibrillären Kollagenpolymeren (Abb.1d). Dabei sind die längsgerichteten Aneinanderreihungen der Moleküle („Protofibrillen“) seitlich jeweils um $\frac{1}{4}$ einer Moleküllänge versetzt. Diese $700\text{\AA}$ entsprechen ungefähr der Periode des Querstreifungsmusters (Abb.1b und d).

Das Kollagenmonomer besteht seinerseits aus 3 Polypeptidketten. In etwas differenter, aber homologer Sequenz sind sie je aus etwa 1000 Aminosäuren aufgebaut und über Wasserstoffbrücken

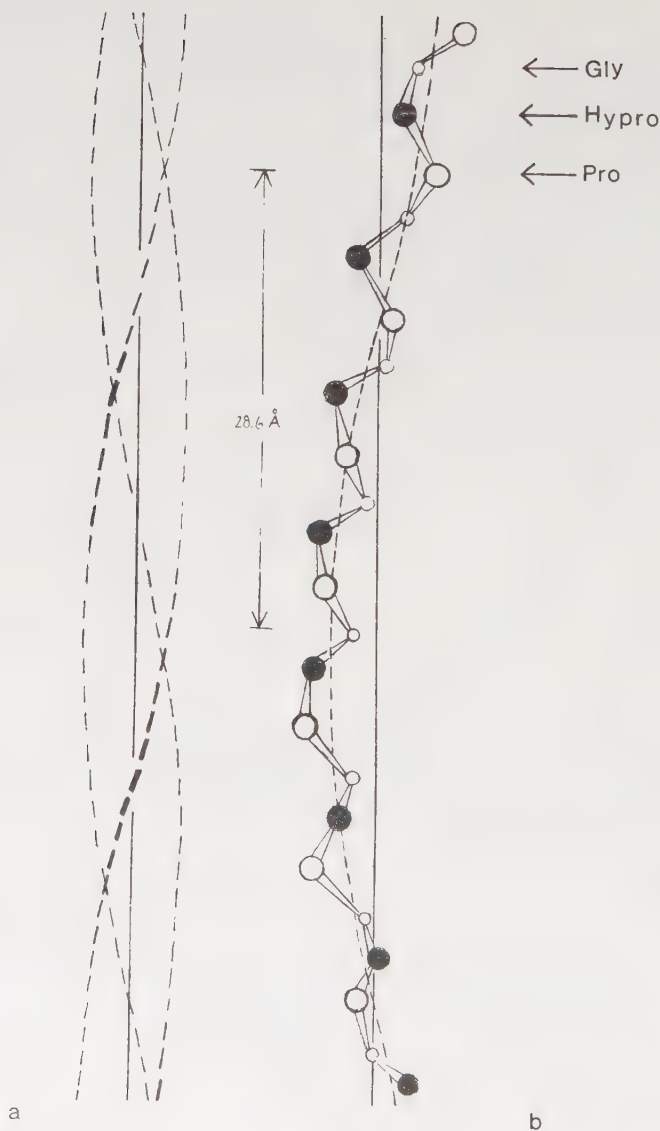


Abb.2: Rechtsgängige Tripelhelix aus 3 intramolekular vernetzten Polypeptidketten (a) - Ausschnitt aus der steilen, linksgängigen Helix einer kollagenen Polypeptidkette mit 3 Aminosäuren pro Windung (b), (nach Rich u. Crick).

zu einer rechtsgängigen Tripelhelix verdrillt (Abb.2a), der Tertiärstruktur des Kollagens. Jede der drei Polypeptidketten entspricht in der Sekundärstruktur ihrerseits dem Modell einer steilgängigen Schraube mit drei Aminosäuren pro Windung (Abb. 2b), freilich der übergeordneten Tripelhelix gegenläufig. Ein kleiner Abschnitt am N-terminalen Stück jeder Kette ist in seiner Struktur und Sequenz nicht wie die Helix gebaut. Dieses sogenannte Telopeptid hat u.a. Bedeutung für die Ausbildung der Tertiärstruktur (Tripelhelix) und die der Quartärstruktur (Fibrille) des Kollagens (66).

Der Wechsel polarer und apolarer Bereiche in der Aminosäuresequenz der einzelnen Polypeptidketten charakterisiert schliesslich die Primärstruktur des Kollagens. In den apolaren Abschnitten finden sich überwiegend doch nicht ausschliesslich neutrale Aminosäuren. Die Sequenz Gly-Pro-X (Glyzin-Prolin-X) wiederholt sich ständig, wobei für X neben Glyzin, Alanin, Phenylalanin u.a. vor allem Hydroxyprolin gefunden wird. Die letztgenannte Aminosäure ist nahezu spezifisch für Kollagen. In dessen polaren Bereichen soll ebenfalls jede dritte Aminosäure Glyzin sein. Im übrigen überwiegen hier teils Aminosäuren mit einem saueren Rest wie Glutamin- und Asparaginsäure, teils überwiegen solche mit einer basischen Seitenkette, etwa Lysin und Arginin (58,36).

Die Anordnung innerhalb der Tripelhelix ist derart, dass die raumfordernden Reste der polaren und schweren Aminosäuren (z.B. die Ringe des Prolins und des 3- bzw. 4-Hydroxyprolins) nach aussen gerichtet sind und das seitenkettenfreie Glyzin innen liegt. Während die apolaren Bereiche von besonderer Bedeutung für die Ausbildung der intramolekularen

Tertiärstruktur des Kollagens in der Tripelhelix sind, steuern die polaren Abschnitte die intermolekulare Vernetzung zur Quartärstruktur der Fibrillen mit.

1.4. Die hämostatisch aktiven Gruppen und Strukturen des Kollagens

Noch nicht sehr breit ist die Frage bearbeitet, welche Gruppen oder Strukturen des Kollagens für seine Wirksamkeit in den entsprechenden Schritten der Hämostase nötig sind. Die Aktivierung des Hageman-Faktors und die kollageninduzierte Plättchenaggregation gelingen in vitro sowohl mit Suspensionen kollagener Fibrillen, als auch mit säure- bzw. neutralsalzlöslichen Kollagenmonomeren ($^{124}_{43}, ^{6}_{55}$). Beide Eigenschaften verliert das Kollagen mit dem Verlust seiner Tripelhelix, etwa durch Behandlung mit 25% Alkohol, Formamid, Kollagenase oder nach Hitzedenaturierung ($^{48}_{124}, ^{128}$).

Die Fähigkeit Plättchen zunächst zu adhärieren und daraufhin zu aggregieren, soll besonders an die freien, positiv geladenen Aminogruppen, speziell die ϵ -Aminogruppen des Lysins, gebunden sein (125). Dagegen verliert das Kollagen seine aktivierende Eigenschaft auf den Hageman-Faktor angeblich weitestgehend nach Blockierung der freien, negativ geladenen Karboxylgruppen (124).

Die Entfernung der Teloptide des Kollagens durch Pepsin ist ebenfalls mit einer ausgeprägten Abnahme der aktivierenden Wirkung auf den Faktor-XII verbunden (124). Die plättchenaggregierenden Eigenschaften verändern sich dabei wenig ($^{125}, ^{126}$). Im übrigen soll die letztgenannte Wirkung des Kollagens, gewon-

nen aus Gewebeproben verschieden alter Individuen, mit zunehmendem Alter abnehmen ($\frac{6}{71}$). Eine deutliche Spezifität der Kollagenwirkung auf Plättchenaggregation und Faktor-XII-Aktivierung wird bis jetzt nicht beschrieben (128), und ist auch nicht, zumindest in qualitativer Hinsicht, zu erwarten (80, 98).

1.5. Die Stellung der kollageninduzierten Schritte und deren Störung im Ablauf der Hämostase

Die Stellung der kollageninduzierten bzw. -aktivierten Schritte im Ablauf der Hämostase sei nun kurz umrissen. Der letzteren schafft zunächst die Einengung des Querschnitts, aus dem es blutet, eine günstige Ausgangslage. Die Wände der Kapillaren kollabieren, bei Arteriolen und Venolen kontrahieren sie sich teils aktiv mittels ihrer glatten Muskelzellen, teils passiv durch das Nachgeben des Tonus der wandständigen elastischen Fasern.

An den traumatisch freigelegten kollagenen Fibrillen bzw. Fibrillendübeln der Gefäßwand adhärieren die ersten herangespülten Thrombozyten (s.o.). Diese Reaktion scheint recht spezifisch zu sein, da keine anderen Zellformen des Blutes am Kollagen adhärieren. Die Adhäsion der Plättchen am Kollagen setzt aus diesen in der sogenannten "release reaction" (Grette 1962) eine Reihe hämostaseaktiver Substanzen (Tab.1) frei ($\frac{34}{49}, \frac{37}{113}, \frac{46}{113}$). Weitere körpereigene und -fremde Wirkstoffe, die ebenfalls eine derartige Freisetzungsreaktion herbeizuführen vermögen, führt Tab.2 auf.

Das freigesetzte ADP aggregiert nun die weiteren, herangespül-

a) Adeninnukleotide	:	ADP ATP
b) Biogene Amine	:	Serotonin Adrenalin Histamin
c) Plättchenständige Gerinnungsfaktoren	:	Plättchenfaktor 3 Plättchenfaktor 4 Fibrinogen
d) Lysosomale Enzyme	:	β -N-Azetylglukosaminidase α -Glukuronidase β -Galaktosidase Kathepsine
e) Ionen	:	Kalium Kalzium

Tab.1: In der "release reaction" aus Blutplättchen freigesetzte Substanzen.

a) Kollagen	
b) Proteolytische Enzyme	: Thrombin Trypsin
c) Antigen-Antikörperkomplexe Globulinbeladene Latexpartikel Aggregierte γ -Globuline	
d) ADP und biogene Amine	: Adrenalin Serotonin Noradrenalin
e) Bakterielle Endotoxine	

Tab.2: Substanzen, die eine "release reaction" der Plättchen bewirken.

ten Plättchen zunächst locker und reversibel (^{19,35,73}). Unter Ausbildung der "Viskösen Metamorphose" (³²) werden die reversiblen Aggregate durch erste Thrombinspuren irreversibel (¹²⁷). Die ebenfalls beim Releasing freigesetzten biogenen Amine Ad-

renalin und Serotonin haben wohl eine aggregationsfördernde Wirkung (3,87).

Den derart aus irreversiblen Thrombozytenaggregaten gebildeten Plättchenpfropf verstärkt und festigt nun die einganggekomene Fibrinbildung des Plasmas. Wie die visköse Metamorphose benötigt sie bekanntlich ebenfalls Thrombin, das zentrale Enzym der Hämostase. Am Anfang dessen äusserst komplexer Bil-

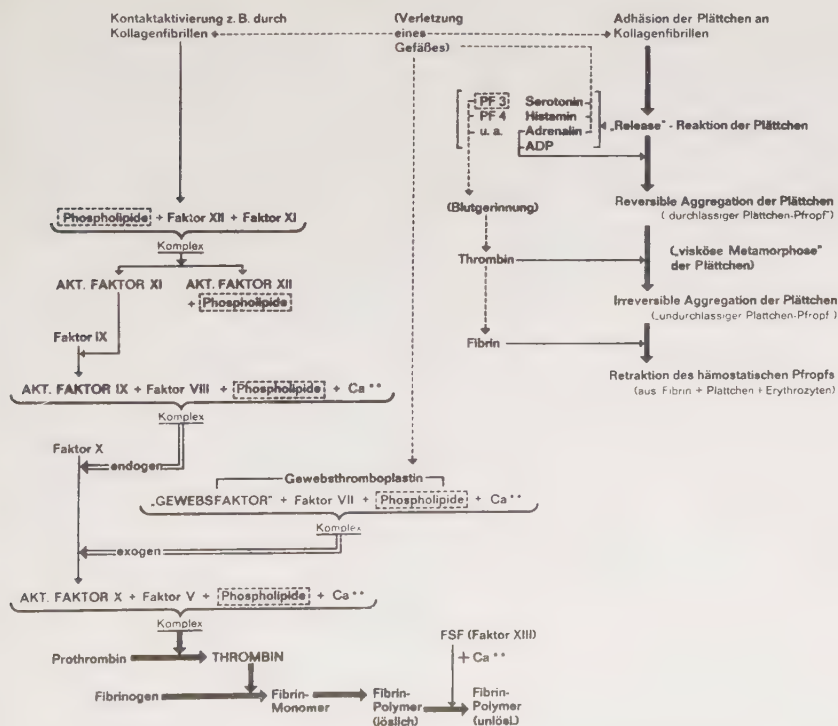


Abb.3: Schema der Blutgerinnung (teilw.n. E.F.Mammen,) und der Plättchenfunktionen. Stellung der kollageninduzierten Schritte.

dung aus Prothrombin über Prethrombin steht im endogenen System der Blutgerinnung die Aktivierung des Faktors-XII. Dies

erfordert dessen Kontakt mit einer Fremdoberfläche, die physiologischerweise Kollagenfibrillen abgeben (s.o.).

Störungen und Defekte in den ersten drei hämostatischen Thrombozytenfunktionen findet man einerseits bei einigen Krankheitsbildern, andererseits lassen sie sich durch Thrombopathifantien (Marx) erzeugen. So ist die Kollagenadhäsion von trypsin- oder papainbehandelten Plättchen gehemmt (50). Einige Antihistamine, Natriumfluorid und Quecksilberchlorid sollen die gleiche Reaktion ebenfalls stören (54).

Bei Thrombasthenikern (^{45, 54}/₁₁₂) und Trägern eines M.v.Willebrand-Jürgens (21, 45) ist die Kollagenadhäsion der Plättchen erhalten. Die kollageninduzierte Aggregation funktioniert dagegen

a) Adeninnukleotide	:	AMP ATP Adenosin 2-Chloradenosin
b) Pharmaka	:	Azetylsalizylsäure Phenylbutazon Indometacin Sulfinpyrazon Novaminsulfon Antihistamine Dipyridamol Clofibrat Papaverin
c) Enzyminhibitoren	:	Zyanid Moniodazetat Oligomyzin
d) Ferner	:	Prostaglandin-E1 Frühe Fibrinabbauprodukte

Tab.3: Inhibitoren der Plättchenaggregation

zwar beim letztgenannten Krankheitsbild, Thrombasthenien (21) zeigen aber eine völlige, Thrombozytopathien (40, 121) als Folge unterschiedlicher Grundkrankheiten eine verschieden starke

Hemmung dieser Thrombozytenfunktion. Im übrigen ist bereits auch eine Reihe von Substanzen und Wirkstoffen bekannt, welche nach Einnahme in vivo und bzw. oder nach Zugabe in vitro die Plättchenaggregation durch Kollagen und andere Aggregantien hemmend beeinflussen (Tab.3).

1.6. Folgerungen für Hämostaseologie, Klinik und Kollagenforschung.

Die Klärung offener Fragen im Zusammenhang mit der Aktivierung und den Leistungen der Thrombozyten, die aktuelle Notwendigkeit plättchenwirksame Pharmaka differenziert untersuchen zu können und schliesslich die Forderung des Klinikers nach genaueren diagnostischen Aussagen zu Thrombozytopathien verlangen nach einem vielseitigen und gut standardisiertem Kollagenpräparat für das klinische, speziell für das hämostaseologische Laboratorium.

Im übrigen könnten sich Blutplättchen wegen ihres äusserst empfindlichen Adhäsions- und Aggregationsverhaltens als spezifisches Substrat für Kollagen in biologischen Tests anbieten, um Fragestellungen der Kollagenforschung zu untersuchen.

2. Material und Methoden

2.1. Die Kollagenpräparationen

An den vorausgegangenen Ausführungen hat sich die Wahl der Kollagenpräparationen orientiert, die in den Experimenten der vorliegenden Arbeit Verwendung gefunden haben.

Als Ausgangsmaterial zur Präparation polymeren Kollagens dient ein Trockenschaum nativer, nicht denaturierter Kollagenfibrillen (108) aus dem equinen tendo calcaneus, kurz Kollagenschaum genannt. Eine abgewogene Menge desselben - z.B. 10mg - werden mit aq.bidest. - z.B. 10ml - überschichtet, welches mit einer organischen Säure wie Ameisen-, Essig-, Milch- oder Zitronensäure bzw. mit einem geeignetem Gemisch derartiger Säuren auf einen pH-Wert von 3 eingestellt ist.

Nach einer Quellzeit von einigen fünf Minuten bei 4°C erfolgt eine erste Zerkleinerung des Kollagenschaums über 10 Minuten in einem Potter-Homogenisator (B.Braun AG, Melsungen). Daran schliesst sich bei dem als Beispiel angegebenen Ansatz eine zehnminütige Behandlung der Suspension mit einem Ultraturrax Dissolver (IKA Werk, Stauffen/Breisgau) an. Das gesamte Homogenisieren bzw. Suspendieren erfolgt ebenfalls bei einer Temperatur von 4°C. Die derart gewonnenen sauer suspendierten Kollagenfibrillen entsprechen der Präparation SSKF. Modifikationen bei der Herstellung der weiters verwendeten Kollagenschaumpräparationen sind der Tab.4 zu entnehmen.

Säurelösliches Kollagen von Kalbshäuten (SLK), welches wir Herrn Prof.Dr. K.Kühn, Max Planck Institut für Eiweiss und Lederforschung, Martinsried, verdanken, dient neben SLK aus dem

SKP	in zitratisierter Ringerlösung (1ad10) suspendierte Kollagenschaum-Partikel
SSKF	sauer suspendierte Kollagenfibrillen
SSKF(RiZ)	SSKF in zittr.Ringerlsg. (1ad10)
SSKF(NaCl)	SSKF mit NaCl u.a. 0,9%
SSKF(U)	Überstand der SSKF nach zweimaliger Zentrifugation (à 1h bei 4000g)
SSKF(H40)	einstündig bei 40°C erhitzte SSKF
SSKF(H70)	einstündig bei 70°C erhitzte SSKF
SSKF(T140)	SSKF aus zweistündig bei 140°C trocken erhitztem Kollagenschaum

Tab.4: Übersicht über die im folgenden verwendeten Kollagenpolymere.

„Aggregatest“-Set (Laboratoire Stago, Paris) als Quelle für monomeres Kollagen. Die Lyophilisate der verschiedenen SLK (s. Tab.5) werden entsprechend der SSKF behandelt (s.o.), wonach sie dann allerdings nicht in Suspension sondern in Lösung vorliegen.

SLK(RiZ)	in zitratisierter Ringerlösung (1ad10) suspendiertes SLK
SLK(St)	SLK der Fa. Stago
SLK1	gegen KCN/Na ₂ HPO ₄ gefälltes SLK, rekonstituiert sich fibrillär
SLK2	mit Azeton gefälltes SLK, rekonstituiert sich amorph
SLK(BrCN)	Kollagenpeptide aus BrCN-abgebautem SLK

Tab.5: Übersicht über die im folgenden verwendeten Kollagenmonomere.

Die Stammsuspensionen polymeren und die Stammlösungen monomeren Kollagens sind jeweils 100mg%ig hergestellt und bei 4°C

gelagert worden. Davon ausgehend werden die benötigten Testkonzentrationen an Kollagen jeweils frisch durch Verdünnen mit angesäuertem aq.bidest. von pH 3 gewonnen.

2.2. Verwendete Substanzen und Reagentien

Als Aggregantien für vergleichende Untersuchungen finden ADP (Boehringer Biochemica, Tutzing/Obb.), Adrenalin aus dem »Agregetest«-Set (Laboratoire Stago, Asnières-sur-Seines, Frankreich) und »Cialit« (2-(aethyl-mercuri-mercaptop)-benzoxazol-5-carbonsaures Natrium, Asid, Lohhof b. München) Verwendung. In jedem Fall werden deren Lösungen am Tag der Verarbeitung mit physiologischer Kochsalzlösung frisch hergestellt und bei 0 bis 4°C gelagert.

Bei der Fülle der bereits bekannten Substanzen aus verschiedenen Gruppen (s. Tab.3, S.12) mit einer hemmenden Wirkung auf die Aggregation der Blutplättchen, sind für einige der nachfolgenden Untersuchungen Azetylsalizylsäure (ASS), Phenylbutazon, Indometacin und Novaminsulfon ausgewählt worden. Ihrer Löslichkeit entsprechend werden sie für in vitro Versuche in physiologischer Kochsalzlösung oder in autologem Plasma gelöst.

Wie bereits erwähnt finden als Lösungs- bzw. Suspensionsmittel physiologische Kochsalzlösung und aq.bidest. - u.U. mit einer organischen Säure wie Essigsäure odgl. (DAB 7) sauer eingestellt - sowie Ringerlösung Anwendung. CaCl_2 -Lösung dient n/40 molar zur Rekalzifizierung und 10mg%ig als Ca -Quelle bei Untersuchungen zur Plättchenaggregation.

2.3. Präparation des Blutes und der Blutplättchen

Die Blutgewinnung erfolgt entsprechend den Kautelen der Gerinnungsanalytik und aus der v.cubitalis mit Polypropylen-Einmalspritzen. In ihnen ist im allgemeinen 3,8%ige Natriumzitratlösung als zehnter Teil des abzunehmenden Blutvolumens zur Gerinnungshemmung vorgelegt. Für den gleichen Zweck finden in einigen Versuchen Heparin (Roche), „Calciparin“ (Heparin „Choay“), je 5mg%ig in physiologischer Kochsalzlösung, sowie 2%ige Sequestrenlösung Verwendung.

Das derart gewonnene Blut wird frisch in paraffinierten Plastikröhrchen mit Hilfe einer Laborzentrifuge 10 Minuten bei 200g sedimentiert, anschliessend das überstehende, plättchenreiche Plasma (PRP) abpipettiert. Es folgt die 20 minütige Zentrifugation des verbliebenen Restes bei 3800g zur Gewinnung von plättchenfreiem Plasma (PFP). Zum Auspressen von Serum aus vollständig durchgeronnenem Blut wird in gleicher Weise aber zwei Mal aufeinanderfolgend zentrifugiert.

Um Blutplättchen zu waschen wird PRP aus Sequestrenblut im Verhältnis 1:9 mit 0,9%iger NaCl-Sequestrenlösung (1 Teil 2%ige Sequestrenlösung auf 9 Teile physiologische Kochsalzlösung) gemischt und 10 Minuten bei 1900g zentrifugiert. Nach Abkippen des Überstandes wird der Bodensatz aus u.U. auch mehrmals gewaschenen Plättchen z.B. in Ringerlösung, Serum odgl. aufgerührt, d.h. resuspendiert. Die Lagerung sowohl des PRP und PFP als auch der gewaschenen Plättchen hat sich besonders in paraffinierten Plastikröhrchen bei ca. 18°C bewährt.

2.4. Angewendete Tests bzw. Untersuchungsmethoden und deren Durchführung

Im Zusammenhang der vorliegenden Arbeit kommt vor allem Tests und Untersuchungsverfahren Bedeutung zu, welche die Aggregation und die Adhäsion von Blutplättchen erfassen.

2.4.1. Plättchenzählung, mikroskopische Beobachtung und Dokumentation verschiedener Plättchenleistungen

Als einfachste Möglichkeit und gut brauchbare Kontrolle für die Feststellung makroskopisch noch sichtbarer Plättchenaggregate dient die Beobachtung des PRP mit einer Lupe im Gegenlicht. In Abhängigkeit von der Art des verwendeten Aggregans und seiner Menge imponieren die Aggregate als feinste, dicht schwebende Partikelchen, Flöckchen oder Flocken, die regelrechte Präzipitate abgeben können.

Die direkte Beobachtung aggregierter und etwa an einer Kollagenfibrille adhärierter Plättchen, sowie die unerlässliche Kontrolle einer Plättchenaggregation in mikroskopischer Größenordnung, gewährleistet ein Phasenkontrastmikroskop »Standard«GFL mit Neofluar Ph Objektiven 1:16, 1:25, 1:40 (Carl Zeiss, Oberkochen). Die Herstellung der mikroskopischen Präparate erfolgt auf einfachste Weise. Auf einen herkömmlichen Objektträger wird ein Tropfen des entsprechenden Untersuchungsgutes aufgebracht und mit einem Deckglas bedeckt. Eine mikrofotografische Dokumentation ermöglicht unter Verwendung eines »Ukatron« UN60 Blitzlichtgenerators (Carl Zeiss, Oberkochen) als Lichtquelle und Agfa IFF Film als Aufnahmematerial die zum »Standard«GFL gehörige Aufsetzkamera (24x36mm). Alle

Makrofotografien sind dagegen auf Ilford FP3 Film mit einer »Nikkormat«FTN Fotokamera (Nippon Kogaku K.K., Tokyo) bei künstlichem Licht aufgenommen.

Die Thrombozyten des PRP (Vollbluts) werden nach der Methode von Feissly-Lüdin in der Modifikation von Marx und Derlath (79) gezählt. Dazu wird eine Leukozytenpipette bis zur Marke 0,5 mit PRP (Vollblut) und mit 2,0%iger Novocainlösung weiter bis zur Marke 11 aufgezogen. Nach zweiminütigem Mischen in einem üblichen Vibrationsmischer - fünfzehnminütiges Mischen bei Vollblut, um eine ausreichende Hämolyse aller Erythrozyten durch die Novocainlösung zu erreichen - beschickt man mit diesem Gemisch eine Zählkammer nach Neubauer. Letztere ist dann für ca. 20 Minuten in einer feuchten Kammer zu inkubieren, um dem Austrocknen während der notwendigen Sedimentation der Plättchen zu begegnen. Sie werden schliesslich mit Hilfe des Phasenkontrastmikroskops in 5 der 9 Kammerquadrate zu je 16 Feldern ausgezählt. Die ermittelte Gesamtzahl an Plättchen mit 1100 (bei 1ad10 mit Natriumzitrat odgl. verdünntem Blut) multipliziert ergibt die Thrombozytenzahl/mm³ PRP (Vollblut).

2.4.2. Turbidimetrische Messung der Plättchenadhäsion, -sphärisierung und -aggregation nach Born

Als elegante und ausdrucksreiche Messung der Aggregation und Sphärisierung von Thrombozyten, sowie von deren Adhäsion an kollagenen Fibrillen und vor allem zur Erfassung der Dynamik und des zeitlichen Ablaufs dieser Plättchenleistungen, empfiehlt sich die Aggregometrie nach Born (11). Der verwendete Originalapparat (Department of Pharmacology, Royal College of

Surgeons, London) besteht aus einem modifizierten EEL 401 Fotometer mit einer zusätzlich eingebauten Magnetröhreinrichtung (1200 U/min) und einem in seiner Temperatur durch Anschluss an einen üblichen Gerinnungsthermostaten regulierbaren Küvettenhalter (Abb.4).



Abb.4: Arbeitsplatz mit Born-Aggregometer (Mitte), Vitatron Schreiber (rechts) und Gerinnungsthermostat (links).

Für den Zweck der Aggregometrie etc. erfüllt das Fotometer die Aufgaben eines Turbidimeters. Durch Aggregatbildung, Sphärisierung oder Adhäsion der Plättchen im PRP verändert sich dessen Trübung und damit die Streuung des Primärlichts der Fotometerlampe, d.h. die Durchlässigkeit der PRP enthaltenden Küvette für ebendieses Primärlicht. Dessen durch Streuung verursachte Extinktion misst die Fotozelle des Fotometers. Die grafische Registrierung und Dokumentation der Messung be-

besorgt ein angeschlossener Kompensationsschreiber (Vitatron, Dieren/Holland). Während eine erste Methode Thrombozytenaggregatione fotometrisch zu erfassen von Jürgens und Braunsteiner 1950 (60) angegeben worden ist, haben Born (11) und O'Brien (89) 1962 modifizierte Fotometer mit Rührvorrichtungen zur Messung der Thrombozytenaggregation angegeben.

Für jede Test- bzw. Messreihe im Aggregometer werden die benötigten, zuvor silikonisierten ("Siliclad", Clay Adams, bezogen durch IMA, Giessen/Lahn) Küvetten (je 3-4 Mal zu verwenden, gutes Spülen vorausgesetzt) mit aq.dest. gefüllt auf gleiche Lichtdurchlässigkeit geprüft. Anschliessend iustiert man das Fotometer mit jedem Plasma individuell derart, dass durch das PFP 100% und durch das PRP 10% des emittierten Lichtes treten. Beim Einfüllen des PRP (1ml) in die Küvette wird dies durch Mischen mit PFP auf die gewünschte Plättchenzahl/cmm eingestellt. Nach einer Inkubationszeit von 3 Minuten bei 37°C erfolgt die Zugabe des Rührmagneten, die Inbetriebnahme des Rührmotors und zuletzt die Zugabe des gelösten bzw. suspendierten Aggregans mit einer automatischen 5, 10 oder 20 µl Pipette (Eppendorf Gerätebau, Hamburg).

Das Beispiel einer Aggregationskurve, wie man sie mit dieser beschriebenen Methode erhält, zeigt Abb.5. Aus der Kurvengehalt und ihrem Verlauf lassen sich Rückschlüsse auf die Aggregation von Blutplättchen im PRP ziehen (92). P_1 entsteht durch das Eintauchen der Pipette bei der Zugabe des Aggregans. Vom Zeitpunkt dieser Zugabe bis zum Einsetzen einer messbaren Aggregation verstreicht die Zeit der Reaktion zwischen Plättchen und Aggregans: Reaktionszeit (a). Die Aggregationszeit (b) wird bis zum Erreichen des Aggregationsmaximums (M) benö-

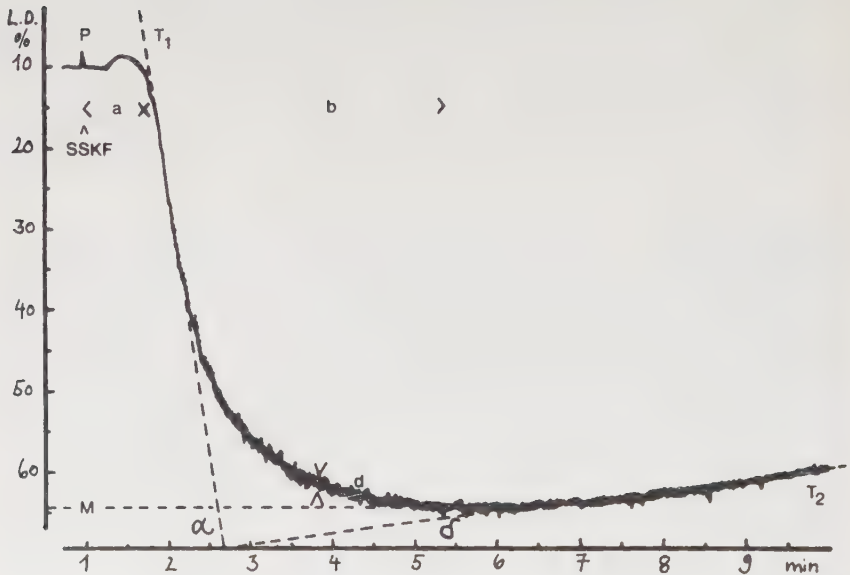


Abb.5: Beispiel einer mit dem Born-Apparat gewonnenen Aggregationskurve unter Verwendung von 0,5 μ g als Aggregans.

tigt, dem Punkt, in dem die Kurve die grösste Lichtdurchlässigkeit in % erreicht hat. In der Phase der stärksten Aggregatbildung pro Zeit erreicht die Kurve ihren stärksten oder steilsten Anstieg. Die Steilheit der Kurve lässt sich durch den Aggregationswinkel (α) ausdrücken, den die Tangente T_1 mit der Abszisse bildet. Entsprechend ist der Desaggregationswinkel (δ), der Winkel zwischen T_2 und der Abszisse. Die Grösse der gebildeten Plättchenaggregate drückt sich schliesslich noch in der Oszillationsbreite (d) der Aggregationskurve aus.

Das eigentliche Geschehen der Aggregation und Adhäsion von Blutplättchen erfasst die turbidimetrische Messung im Born-

Apparat freilich nur indirekt. Um sich deshalb zusätzlich auch ein direktes Bild dieser Vorgänge machen zu können, bewährt es sich während der interessierenden Aggregationsphasen mit einer automatischen 10-Mikroliterpipette aus der Küvette PRP-Proben zu entnehmen und mikroskopisch zu untersuchen (s.o.).

2.4.3. Messung der Plättchenaggregation im zitratisierten Vollblut mit dem Kollagen-Zentrifugiertest nach Marx und Schulte

Für eine Untersuchung der Plättchenaggregation und -adhäsion im Vollblut, die sich vor allem auch in der klinischen Routine als praktikabel erweist, ist im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein Test entwickelt worden, der die Aggregation von Thrombozyten durch Kollagen im Zitratblut (1ad10) mit Hilfe der Sedimentation in einer Zentrifuge erfasst. Die Anregung hierzu gaben Erfahrungen von R.Marx und E.Schweighart, nach denen sie bereits 1957 durch geeignete Zentrifugation Plättchen von Plättchenaggregaten differenzieren konnten (109).

Die für den Kollagen-Zentrifugiertest erforderliche Kollagenpräparation wird an jedem Versuchstag frisch zubereitet. 3,8% iger Natriumzitratlösung werden SSKF einer Stammsuspension (s.S.15) zupipettiert, sodass Suspensionen mit 10, 20, 30 und 50µg kollagener Fibrillen pro ml Natriumzitratlösung entstehen. Sie sind bei 4°C zu lagern. Durch Vorlegen von "leerer" 3,8% iger Natriumzitratlösung (1. und 2. Spritze) und - je nach den individuell interessierenden Kollagenabstufungen - von 10, 20 etc. µg SSKF im ml enthaltender 3,8%iger Natriumzitratlösung (3., 4. Spritze etc.) im Volumenverhältnis 1ad10 zur abzuneh-

menden Blutmenge werden 3 bis 6 Fünfmilliliter Einmalspritzen vorbereitet. Die Blutabnahme mit diesen Spritzen - jeweils bis zur 3ml Marke - beginnt mit der als 1. markierten Spritze. Entsprechend der vorgelegten Natriumzitratlösung enthalten die Spritzen 1. und 2. kein Kollagen, 3., 4., 5. und 6. jeweils 1, 2, 3 und 5µg SSKF pro ml Zitratblut. Sofort nach erfolgter Blutabnahme zieht man in die Spritzen Luft bis zur 5ml Marke nach, mischt den Inhalt 5 Minuten bei 40U/min in einem Drehmischgerät (ReaxII, Heidolph-Elektro KG, Kelheim/Donau) und überführt ihn anschliessend in vorbereitete PVC-Röhrchen. Deren Zentrifugation schliesst sich sofort an: die des ersten Röhrchens zur Gewinnung von PFP in einer Laborzentrifuge (20 Minuten bei 3800g) und die Zentrifugation der Röhrchen 2. mit 4., 5. oder 6. in einer zweiten Zentrifuge (10 Minuten bei 140g) zur Gewinnung von PRP im zweiten und zur Sedimentation der entstandenen Plättchenaggregate in den restlichen Röhrchen. Das geringe Schwerfeld von 140g über 10 Minuten reicht zwar nicht aus Einzelplättchen mit ihrer geringeren Masse zu sedimentieren, genügt aber wohl für die Sedimentation von Aggregaten mit der Masse zahlreicher, vereinigter Plättchen und für die Sedimentation der schwereren Leuko- und Erythrozyten. Der Plasmaüberstand ist nach abgeschlossener Zentrifugation entsprechend der stattgehabten Aggregationsintensität mehr oder weniger plättchenarm bzw. -reich, d.h. auch weniger oder mehr durchlässig für das Primärlicht einer Fotometerlampe. Der Grad dieser Lichtdurchlässigkeit ist ein direkter Masstab für die im Vollblut stattgehabte Aggregation von dessen Plättchenpool. Zur Erfassung der erhaltenen Befunde bietet sich die Turbidimetrie mit einem Fotometer wie dem EEL401 des Born-Ap-

parates, an (s.o.). Dazu wird jeweils 1ml der Plasmaüberstände aus den Röhrchen 1 bis 6 mit einer automatischen Pipette sorgfältig in vorbereitete Küvetten (s.o.) gefüllt. Mit dem PFP des ersten Röhrchens im Lichtgang wird das Fotometer auf eine Lichtdurchlässigkeit von 90% iustiert, mit dem PRP des zweiten Röhrchens auf 5% der L.D.. Die Lichtdurchlässigkeit der Plasmaüberstände kollagenaggregierten Vollbluts liegt dann irgendwo zwischen diesen beiden Leerwerten. Die Messung registriert wiederum der Vitatron Schreiber, der Übertrag der Messergebnisse erfolgt in ein einfaches Schema (Abb.6).

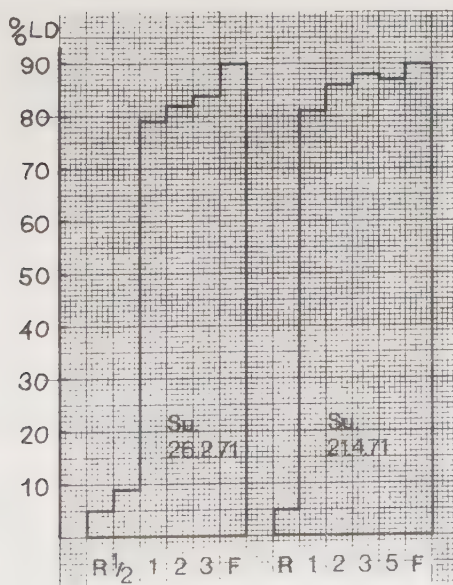


Abb.6: Schema zur Darstellung von im Kollagen-Zentrifugier-test erhaltenen Messergebnissen.

Auf dessen Ordinate ist die Durchlässigkeit der jeweiligen Messküvette für das Licht der Fotometerlampe in % linear ange-

geben (Transmission). Die Bezeichnungen L_1 und L_2 unter der Abszisse stehen für PRP und PFP. Die Indices K_1 , K_2 etc. geben die Kollagensdosis/ml Vollblut an, unter der die entsprechende L.D. erzielt worden ist (in μg).

Bei der indirekten Modifikation des Kollagen-Zentrifugiertests besteht der einzige Unterschied zur oben beschriebenen direkten Methode darin, dass die Kollagenfibrillen nicht gemeinsam mit dem Gerinnungshemmer (Natriumzitratlösung) sondern in physiologischer Kochsalzlösung vorgelegt werden.

2.4.4. Retraktion von PRP nach Marx und Murr

Eine weitere Leistung der Blutplättchen - die Retraktion - besteht in dem Vermögen ein lockeres Netz fibriner Fäden - in vivo das Blutgerinnsel - unter Auspressen des enthaltenen Plasmas zu verdichten. Voraussetzung dieser Leistung ist eine Aktivierung oder Stimulierung der entsprechenden Plättchen durch Thrombin, ADP, Adrenalin, Noradrenalin u.a., zum anderen das Vorhandensein eines Retraktionssubstrates, physiologischerweise des Fibrins.

Zur Untersuchung von Kollagen als Plättchenstimulator für die Retraktion wird ein thrombininaktives Solufibrin-Hirudin Testsystem nach Marx und Murr (80) verwendet:

Nacheinander pipettiert man in ein gelatiniertes Reagensglas (20) 0,3ml PRP (aktiviert bzw. für Leerwerte inaktiviert) mit 40ATE Hirudin, 0,5ml Veronalpuffer pH 7,6, 0,5ml aq.bidest., 3,2ml physiologische Kochsalzlösung und zuletzt 0,07ml Solufibrinlösung (120).

Die Aktivierung der Plättchen des verwendeten PRP ist zuvor

nach Zugabe des Stimulators durch leichtes Schütteln erfolgt. Dessen Dauer in Minuten hat dabei für jeden Stimulator ein im Vorversuch zu ermittelndes Optimum. Das System wird schliesslich durch leichtes Kippen gemischt und im Wasserbad eines Gerinnungsthermostaten (z.B. nach Jürgens und Beller, Apparatebau E.Bühler, Tübingen) bei 37°C inkubiert. Nach der 1. und der 2. Stunde wird die Länge des Gerinnsels als Masstab für die ablaufende Retraktion in Millimetern gemessen. Es empfiehlt sich die Retraktionsansätze im Interesse einer besseren Kontrolle wenigstens doppelt anzusetzen.

2.4.5. Untersuchung der Faktor-XII-Aktivierung

Um die Aktivierung des Faktors-XII der Blutgerinnung zu erfassen, inkubiert man bei Zimmertemperatur ($20 - 22^{\circ}\text{C}$) in einem paraffinierten PVC-Röhrchen 3ml PFP mit 0,15ml Suspensions- bzw. Lösungsmittel, welches die verwendete Menge Testsubstanz (Kollagen, Kaolin odgl.) enthält. Mit einem paraffiniertem Stopfen verschlossen, wird dieses Röhrchen in einem »Reax II« Mischer konstant mit 40 U/min gedreht. In jeweils angegebenen Zeitabständen erfolgt die Abnahme von 0,2ml des PFP in ein Uhlenhuthglas. Nach Zugabe von 0,2ml n/40 molarer CaCl_2 -Lösung wird im Gerinnungsthermostaten bei 37°C die Rekalzifizierungszeit im silikonisierten Uhlenhuthglas bestimmt. Entsprechend dem Grad der Aktivierung des Hageman-Faktors fällt letztere kürzer oder länger aus.

3. Experimentelle Ergebnisse

3.1. Voruntersuchungen zu den verwendeten Plättchen-aggregationstesten

Um die Arbeitsweise und die Möglichkeiten zu erfahren, die das Born-Aggregometer bietet, um gleichzeitig dessen Arbeitsweise mit dem zu verarbeitenden Substrat abzustimmen und um einen ersten Überblick über die Leistungsfähigkeit des neuentwickelten Kollagen-Zentrifugiertests zu erhalten, sind zunächst die folgenden Voruntersuchungen angestellt worden.

3.1.1. Abhängigkeit des Kollagen-Zentrifugiertests von der Verarbeitungsdauer des Zitratbluts

Bei den ersten Versuchen im Vollblut mittels Kollagen aggregierte Blutplättchen zu zentrifugieren, konnte die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse garnicht befriedigen. Auf die Vermutung hin die Verarbeitungsdauer könne dafür verantwortlich sein, hat die genauere Untersuchung gezeigt, dass zum einen die kollagenen Fibrillen nach ihrem Kontakt mit Blut innerhalb kürzerer Zeit zusehends an Aggregationskraft verlieren (Abb.7a-c) und zum anderen, dass bereits aggregierte Plättchen nach dem Drehmischen teilweise wieder desaggregieren (Abb.7c). Die Messungen der Abb.7a-c sind mit Blutproben von drei verschiedenen Spendern gemacht. Bei Abb.7a und b entsprechen die Minutenangaben der vom Abschluss der Blutabnahme bis zum Beginn des Drehmischens verstrichenen Zeit. Bei Abb.7c bezeichnet I den Leerwert (kein Zeitverlust nach der Blutabnahme und nach dem

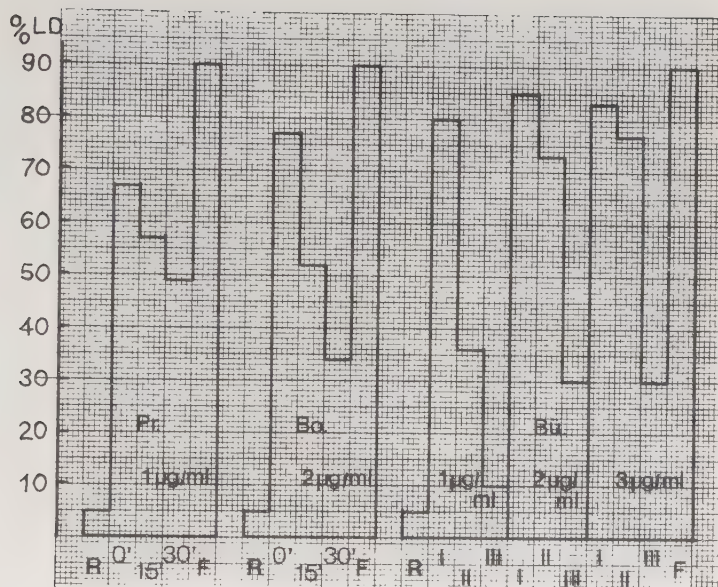


Abb. 7a-c: Abhängigkeit der Intensität der Plättchenaggregation im Kollagen-Zentrifugiertest von der Verarbeitungsdauer des abgenommenen Blutes.
(Erklärungen im Text)

Drehmischen) zu II (30 Minuten Defizit zwischen dem Ende des Drehmischens und dem Beginn des Zentrifugierens) und III (wie II aber zusätzliche 30 minütige Differenz zwischen abgeschlossener Blutabnahme und dem Beginn des Drehmischens).

3.1.2. Reproduzierbarkeit des Kollagen-Zentrifugiertests

Unter Berücksichtigung dieser Erfahrung haben die nächsten Untersuchungen der Reproduzierbarkeit der Kollagenwirkung im Kollagen-Zentrifugiertest an sich gegolten. Dazu ist Blut von acht verschiedenen Spendern (Patienten und gesunde Kontroll-

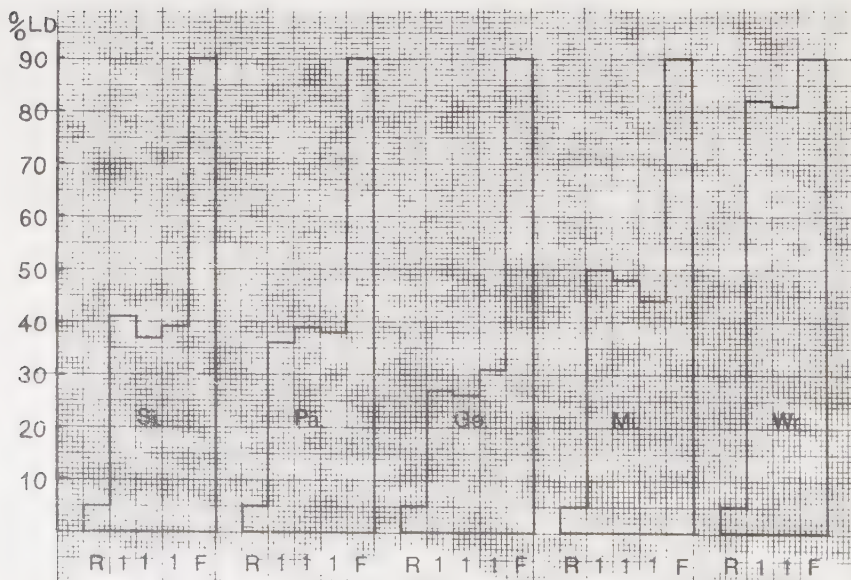
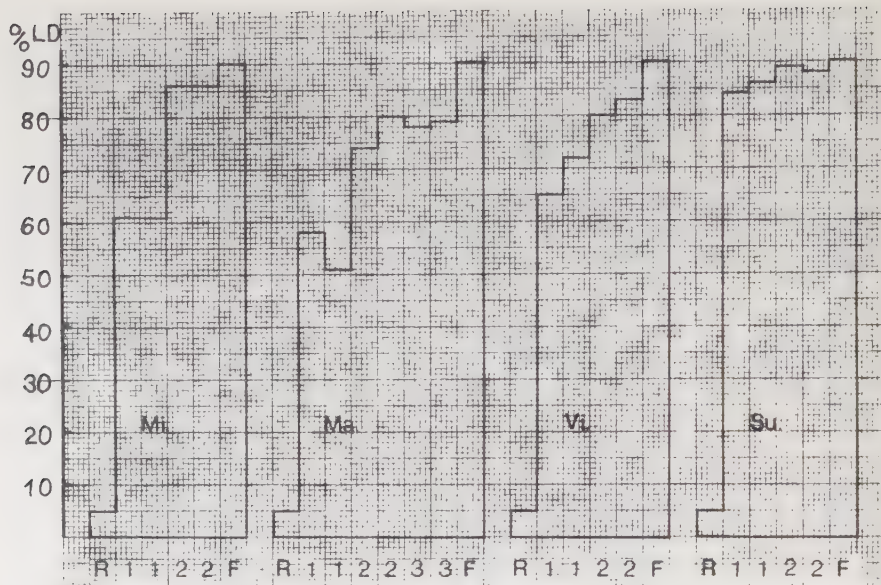


Abb.8: Reproduzierbarkeit der kollageninduzierten Aggregation von Blutplättchen im Kollagen-Zentrifugiertest mit 1, 2 oder 3 μg Kollagen/ml zitratisiertem Vollblut.

personen) jeweils zwei oder drei Mal mit der gleichen Dosis Kollagen (1, 2 oder 3 μg /ml Vollblut) aggregiert worden (Abb.8). Die dabei gemessenen Lichtdurchlässigkeiten (L.D.) schwanken nicht um mehr als 8% in Ansätzen mit gleicher Kollagendosierung.

Um auch eine Aussage zur Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wiederholter Kollagen-Zentrifugiertests mit dem Blut ein und desselben Probanden zu erhalten, ist der Test bei drei gesun-

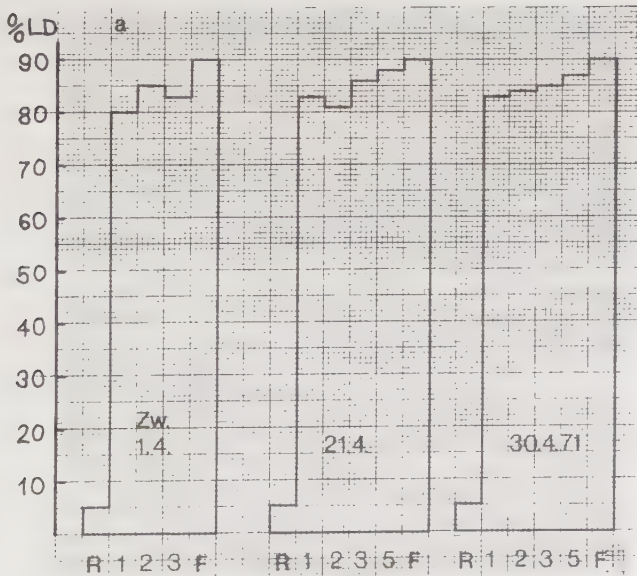
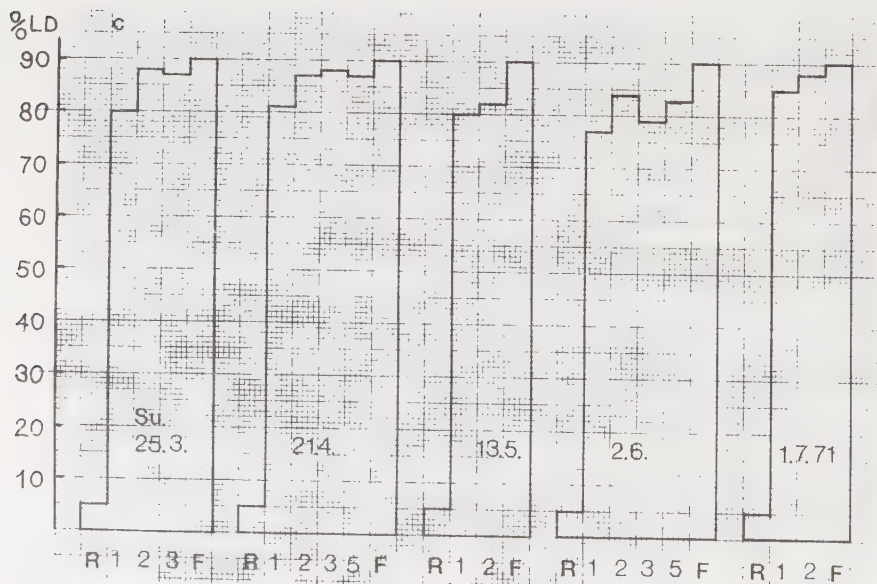
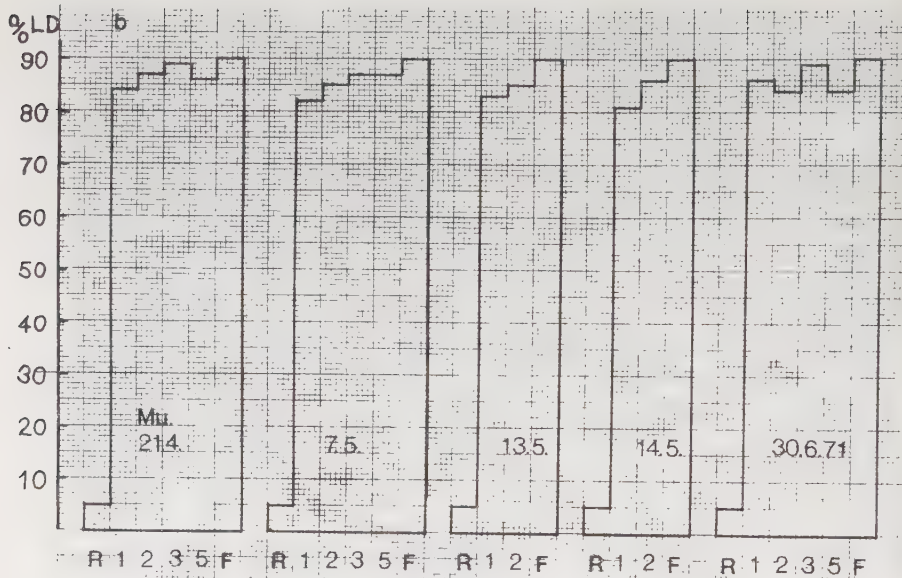


Abb.9a-c: Kollagen-Zentrifugiertest dreier gleicher, gesunder Kontrollpersonen (a, b, c) an verschiedenen Tagen.



den Kontrollpersonen an verschiedenen Tagen wiederholt worden (Abb.9a-c). Dabei entsprechen sich die Ergebnisse der einzelnen Untersuchungen dieser Abbildung recht gut und man kann sagen, dass die Reproduzierbarkeit wiederholter Kollagen-Zentrifugiertests bei ein und derselben Person nicht stärker schwankt als^{jene} bei Wiederholung gleichgrosser Kollagendosen in ein und demselben Testansatz (Abb.8).

Darüberhinaus zeigen die Untersuchungen der Abb.9a-c, in denen zur Plättchenaggregation auch höhere (3 und 5 μ g) Kollagendosen verwendet worden sind, dass es im Kollagen-Zentrifugiertest eine bestimmte Kollagendosis pro ml Blut gibt, deren Erhöhung die Plättchenaggregation im zitratisierten Vollblut kaum bzw. garnicht mehr verbessert. Diese niedrigste Kollagendosis pro ml Blut ("niedrigste maximalaggregierende Kollagendosis") überschreitet in der Norm nicht 2 μ g Kollagen (in Form der SSKF) pro ml Blut.

3.1.3. Der Kollagen-Zentrifugiertest mit lipämischem Blut - Die Abhängigkeit des Tests von der Plättchenzahl

Interessant sind in diesem Zusammenhang die Messergebnisse der Kollagen-Zentrifugierteste von Probanden mit einer makroskopisch am PRP bzw. PFP erkennbaren Lipämie (Abb.10).

Keines der angeführten Beispiele erreicht 65% der L.D., nicht einmal im 3 - oder 5 -Wert, obwohl die Plättchenaggregation in jedem Fall gemessen an der "niedrigsten maximalaggregierenden Kollagendosis" im Bereich der Norm liegt. Diese Beobachtung erklärt ein mit unbewaffnetem Auge zu erhebender Befund: Im lipämischen PFP ist nach der Zentrifugation zumindest ein Teil des Fettes in Schlieren ausgefallen, wogegen die plättchen-

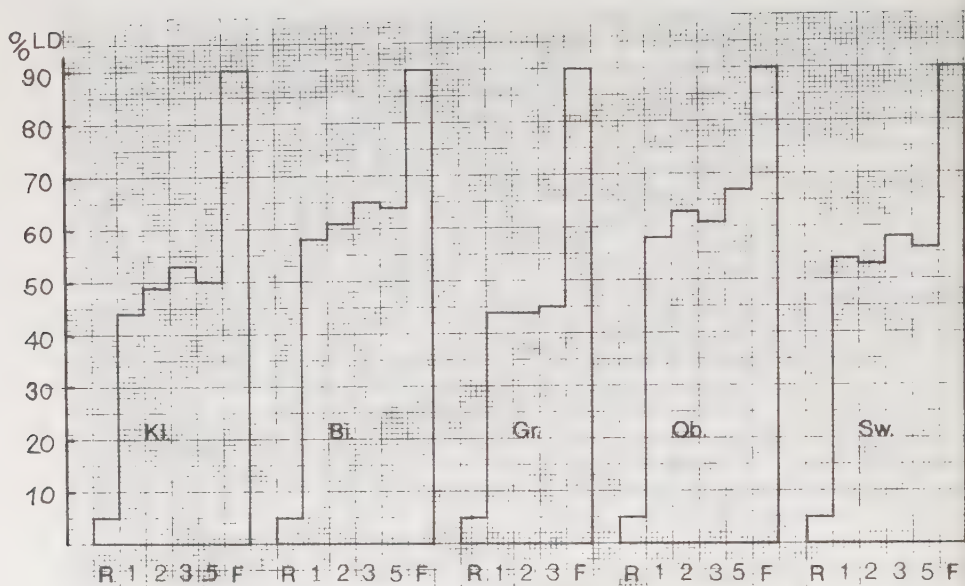


Abb.10: Kollagen-Zentrifugiertests von Probanden mit makroskopisch erkennbarer Lipämie im PRP.

reich zentrifugierten Ansätze 2, 3 und 5 im Überstand die typische homogene Trübung lipämischen Plasmas zeigen. Die Abhängigkeit des Kollagen-Zentrifugiertests von der Blutplättchenzahl im Aggregationsvolumen des verwendeten Vollblutes ist der Gegenstand der nächsten Experimente. In vitro ist Zitratblut mit PRP desselben Zitratblutes auf verschiedenen hohen Plättchenzahlen/cmm von 175.000, 220.000, 250.000 (Abb.11a) und 95.000, 175.000, 280.000 (Abb.11b) eingestellt, und im Anschluss daran nach der indirekten Modifikation (s.S.26) des Kollagen-Zentrifugiertests verarbeitet worden. Darnach hängt das Aggregationsergebnis im Bereich physiologischer Plättchenzahlen pro cmm Blut nicht sehr von der Menge der Thrombozyten ab.

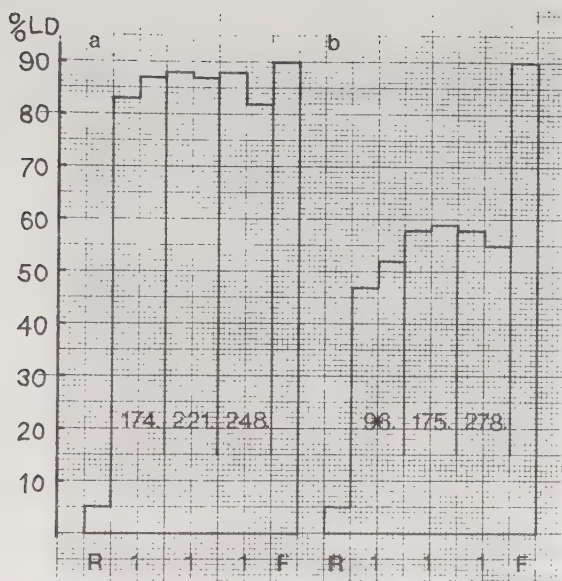


Abb.11a,b: Abhängigkeit des Kollagen-Zentrifugiertests von der Plättchenzahl im verwendeten Zitratblut bei 1 μ g Kollagen (SSKF)/ml Blut.

3.1.4. Normalbereich der Plättchenaggregation im Kollagen-Zentrifugiertest

Schliesslich sind in der Abb.12a,b die Ergebnisse der Kollagen-Zentrifugiertests, ausgeführt mit dem Blut von 94 verschiedenen, gesunden Kontrollpersonen, unter Verwendung von jeweils 1 und 2 μ g Kollagen zusammengefasst. Nach dieser Aufstellung kann man bei Verwendung der SSKF als kollagenem Reagens eine Lichtdurchlässigkeit (L.D.) von mehr als 64% beim 1 μ g-Wert (Abb.12b) und eine L.D. von mehr als 79% beim 2 μ g-Wert als innerhalb eines Normalbereiches gelegen betrachten.

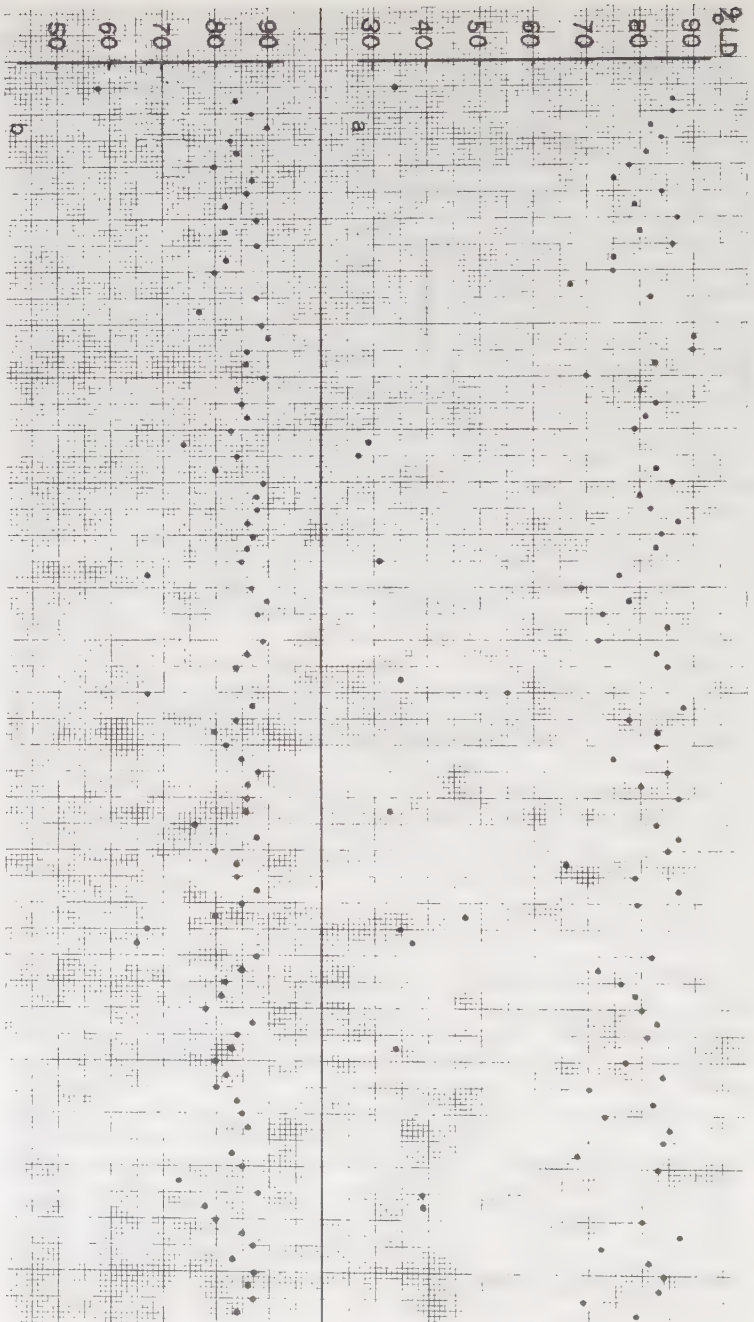


Abb. 12a, b: Messergebnisse der Kollagenzentrifugiertests von 94 verschiedenen gesunden Kontrollpersonen unter Verwendung von 1 (a) und 2µg (b) Kollagen.

3.1.5. Einfluss von Heparin, „Calciparin“ und Natriumzitrats auf die Plättchenaggregation im PRP

Bei der Beschäftigung mit der Messung der Plättchenaggregation im Born-Apparat hat als erste Frage interessiert, inwieweit ein verwendeter Gerinnungshemmer die Aggregation der Plättchen beeinflusst. Zu diesem Zweck wurden einem gesunden Probanden in dreistündigem Abstand je 20ml Blut einmal mit Natriumzitrats, dann mit Heparin und schliesslich mit „Calciparin“ abgenommen und jeweils sofort verarbeitet.

Als Aggregans für die Plättchen diente ADP in Mengen von 1,0µg, 0,5, 0,4 und 0,3µg. Die erhaltenen Kurven (Abb.13a-c) zeigen deutlich die auffallend bessere Aggregation im heparinisierten (c) und „calciparinisierten“ (b) PRP gegenüber dem Zitrats-PRP (a). So waren in letzterem unter 0,3µg ADP aggregierte Plättchen nur noch durch die mikroskopische Kontrolle festzustellen, aber nicht mehr mit der fotometrischen Messung im Born-Aggregometer. Während die Plättchen im heparinisierten PRP noch etwas besser aggregieren als im Calciparin-PRP, desaggregieren die Thrombozyten im letzteren unter stärkeren ADP-Dosen (1,0 und 0,5µg) entsprechend leichter.

Um daraufhin weiteren Aufschluss über den Einfluss eines Gerinnungshemmers vom Heparintyp auf die Plättchenaggregation zu erhalten, ist einem PRP aus „calciparinisiertem“ Vollblut 10 Minuten vor der Aggregation mit ADP (0,5, 1,0 und 2,5µg) im Born-Apparat „Calciparin“ u.a. 7,5 und 10mg% zugesetzt worden. Die Messungen des Aggregationsverhaltens unter diesen Bedingungen demonstriert die Abb.14a,b. In jedem Fall beobachtet man mit der steigenden Calciparinisierung unter gleichen ADP-Dosen eine stärkere Aggregation der Plättchen, verbunden mit

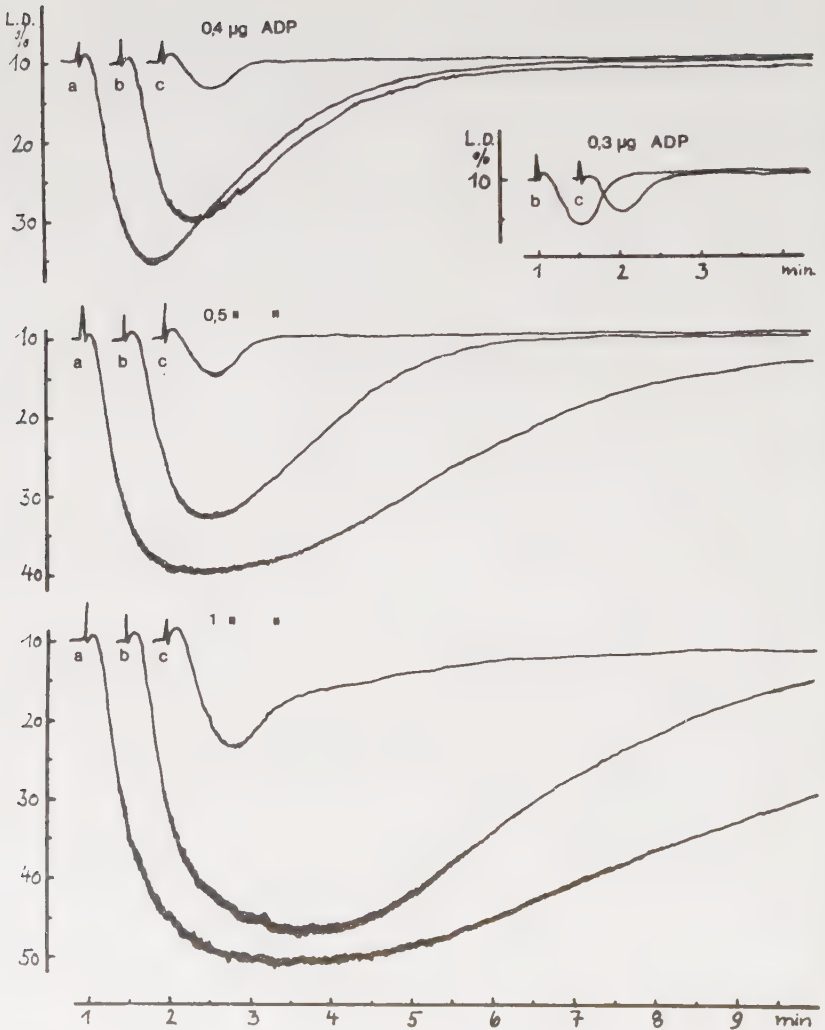


Abb.13a-c: ADP-induzierte Aggregation von Blutplättchen in Zitrat-PRP (a), "Calciparin"-PRP (b) und in Heparin-PRP (c).

einer geringen Desaggregation.

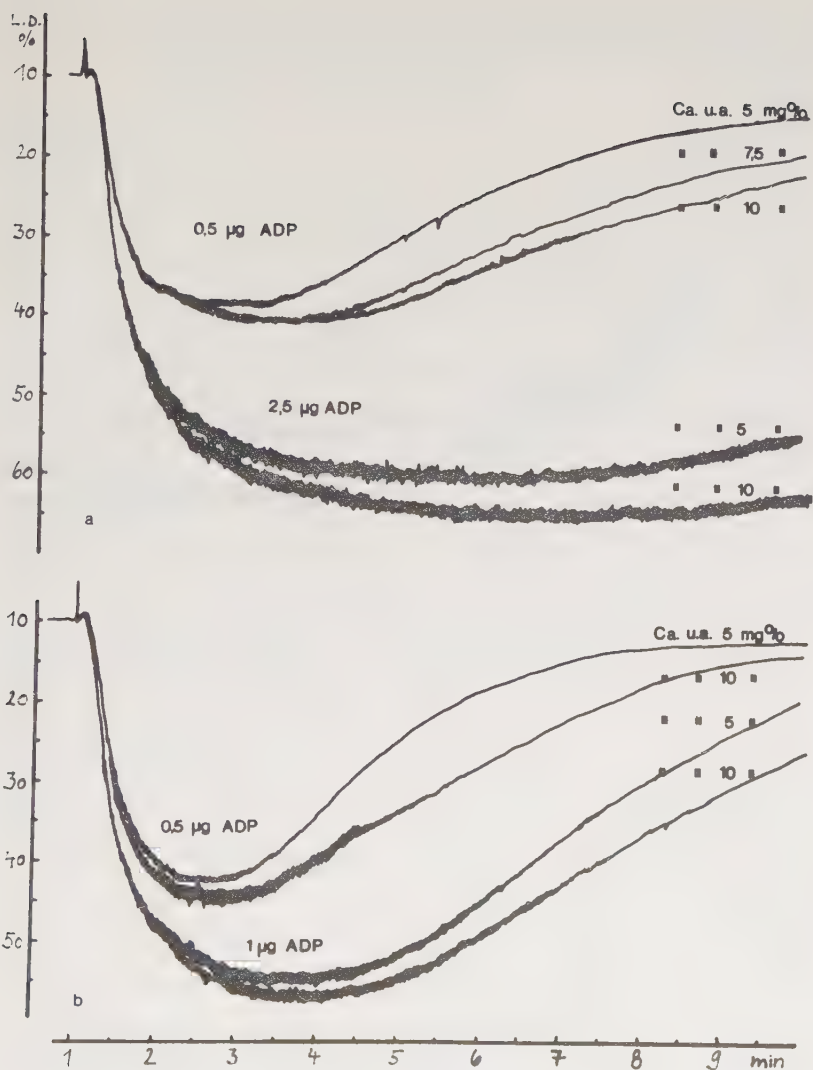


Abb.14a,b: ADP-induzierte Aggregation der Plättchen zweier verschiedener, "calciiparinisierter" PRP unter Zusatz unterschiedlicher Mengen zusätzlichen "Calciiparins".

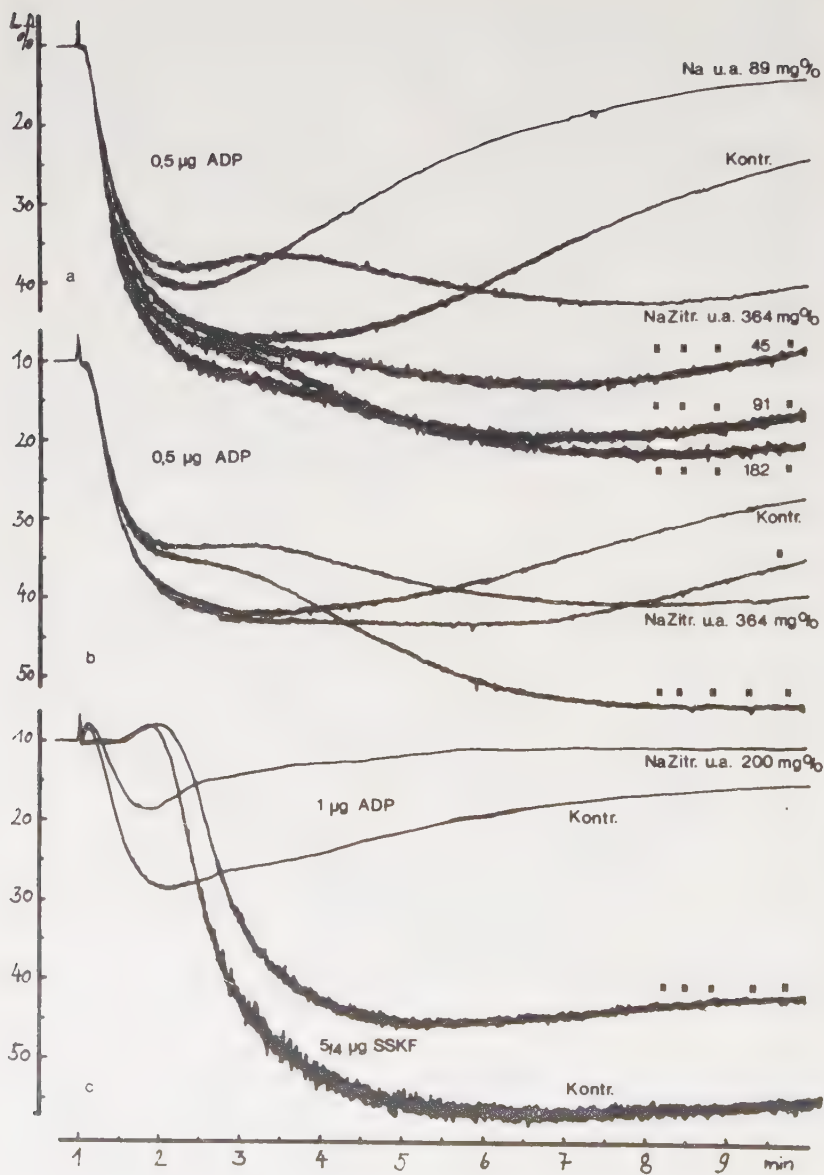


Abb.15a-c: ADP- (a,b) und kollageninduzierte Aggregation (c) von Blutplättchen in "calciparinisiertem" PRP (a,b) und zitratisiertem PRP (c) nach Zusatz verschieden hoher Natriumzitratsdosen.

Für die erste Untersuchung zum Einfluss von Zitrationen ($C_6O_7H_5^{---}$) auf die Plättchenaggregation ist PRP aus "calciparinisiertem" Blut verwendet worden, dem 10 Minuten vor seiner Aggregation mit 0,5µg ADP Natriumzitrats u.a. 4,8, 9,5, 19 und 38mg% zugesetzt wurde (Abb.15a,b). Obwohl die Reproduzierbarkeit der Plättchenaggregation im Calciparin-PRP von Abb.15 nicht sonderlich überzeugt, ist die Tendenz einer Verstärkung der ADP-Wirkung unter einer Natriumzitratsdosis von 38mg% doch recht deutlich. Interessant ist dabei, dass das Auftreten einer "second wave" (s.u.) im zitrathaltigen Ansatz die Verstärkung der Plättchenaggregation verursacht. Diese "second wave" fehlt dem Leerwert, dessen Aggregationsmaximum (hier identisch mit dem tiefsten Punkt der "first wave") im Zitratansatz aber nicht erreicht wird.

Den PRP-Ansätzen aus "calciparinisiertem" Blut der Abb.15a ist Natriumzitrats in fallenden Konzentrationen zugesetzt und einem Ansatz zur Kontrolle auch Na^+ u.a. 10,2mg% (als NaCl) entsprechend dem Na^+ -Gehalt einer 1ad10-Vorlage von 3,8%igem Natriumzitrats. Wie man sieht ist die Zitratwirkung auf die ADP-induzierte Aggregation der Thrombozyten in "calciparinisiertem" PRP dosisabhängig. Die Natriumionen hemmen zunächst die primäre Aggregation der Plättchen bei 0,5µg ADP als Aggregans etwa wie die entsprechende Natriumzitratsmenge, doch bleibt die "second wave" des Zitratansatzes im Natriumansatz aus.

Im Versuch der Abb.15c sind die Plättchen eines Zitrat-PRP mit

1 μ g kollagener Fibrillen (SSKF) aggregiert worden. Der Zusatz von 0,05ml 3,8%igen Natriumzitrats bewirkt hier eine deutliche Verschlechterung der Plättchenaggregation und eine Verlängerung der Reaktionszeit zwischen Plättchen und Kollagenfibrillen.

3.1.6. Abhängigkeit der Plättchenaggregation im PRP von der Plättchenzahl und der Ca^{++} Konzentration

Das Ergebnis der Versuche über die Abhängigkeit der Plättchenaggregation von der Plättchenzahl pro cmm unter ADP hält Abb. 16 fest.

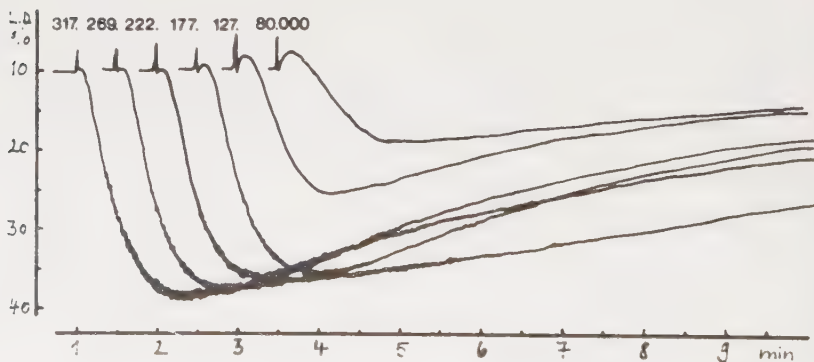


Abb.16: Durch 1 μ g ADP induzierte Aggregation von Thrombozyten im Ziträt-PRP bei verschieden hohen Plättchenzahlen.

Die Plättchenzahl des Ziträt-PRP ist jeweils auf 320.000, 270.000, 220.000, 170.000, 120.000 und 80.000 pro cmm eingestellt und mit 1 μ g ADP/ml PRP aggregiert. Während die Intensität der Aggregation besonders unterhalb einer Plättchenzahl von 150.000/cmm stärker abnimmt, ist das Phänomen des "swel-

ling" (s.o.) bei 80.000 Plättchen/cmm am stärksten ausgeprägt.

Natriumzitrat ist bekanntlich deshalb als Gerinnungshemmer wirksam, weil es die zur Thrombinbildung unerlässlichen freien Calciumionen des Plasmas bindet. Die Abhängigkeit der Plätt-

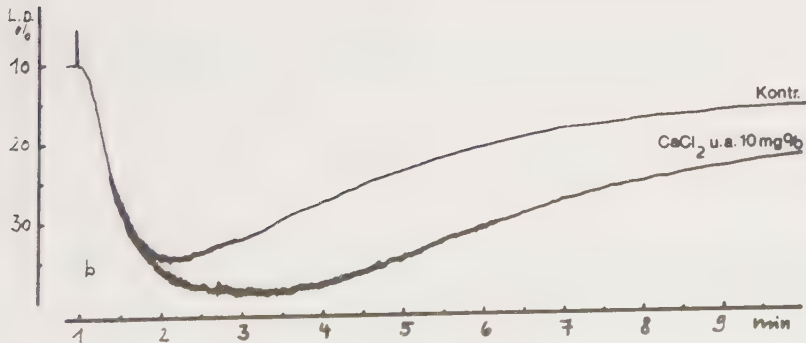
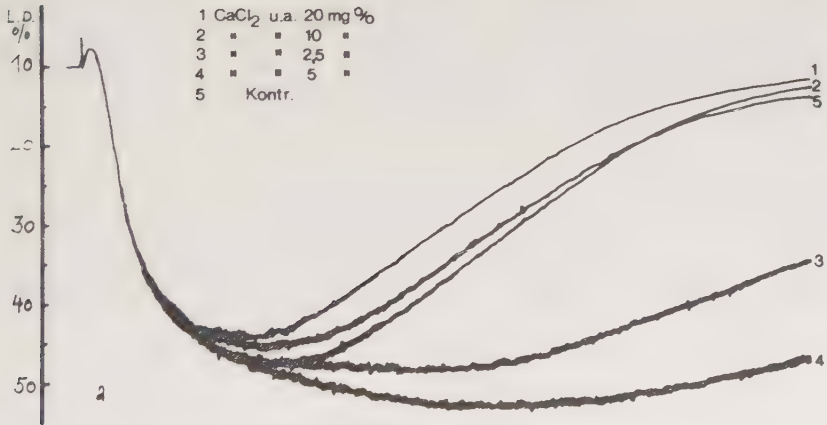


Abb. 17a, b: Einfluss von CaCl₂ auf die ADP-induzierte (1 µg) Plättchenaggregation im Zitrat-PRP zwei verschiedener, gesunder Kontrollpersonen (a, b).

chenaggregation von der Ca^{++} Konzentration ist in der folgenden Untersuchung geprüft worden (Abb.17). CaCl_2 u.a. 10mg% ist dem verwendeten PRP aus Zitratblut 10 Minuten vor der Aggregation mit 1 μg ADP im Born-Apparat zugesetzt worden.

3.1.7. Aggregation gewaschener Plättchen im Born-Aggregometer

Diese Ca^{++} Abhängigkeit der Plättchenaggregation hat sich noch deutlicher bei der Untersuchung von einmal in Sequestrenlösung gewaschenen (s.S.17) Thrombozyten gezeigt (Abb.18).

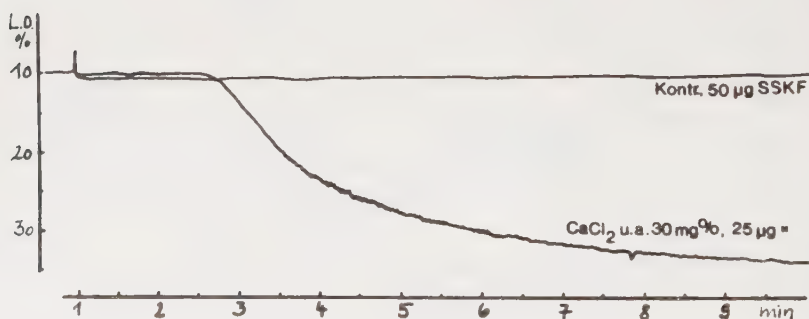


Abb.18: Kollageninduzierte Aggregation sequestrengewaschener Plättchen nach Resuspension in physiologischer Kochsalzlösung mit und ohne Zusatz von CaCl_2 u.a. 30mg%.

Da Sequestren Calciumionen noch stärker bindet als Zitrat dies tut, befinden sich die in mit Michaelis-Puffer auf pH 7,4 eingestellter physiologischer Kochsalzlösung resuspendierten, gewaschenen Plättchen in einem Milieu, welches nahezu kein freies Calcium mehr enthält. Zur Aggregation sind dem Leerwert 50 μg Kollagenfibrillen (SSKF) zugegeben worden, doch zeigt das Aggregometer keine Veränderung in der Lichtdurchlässigkeit der

Messküvette an, die auf eine Reaktion zwischen Plättchen und Kollagenfibrillen schliessen liesse. Der zweite Ansatz, dem CaCl_2 u.a. 30mg% 10 Minuten vor der Aggregation zugegeben wurde, verändert dagegen nach Zugabe von 25µg des selben Kollagens - einer relativ hohen Dosis - seine L.D. so, wie es einer schwächeren Plättchenaggregation entspricht. Dieser Versuch zeigt über die Ca^{++} Abhängigkeit der Thrombozytenaggregation hinaus, dass Blutplättchen zumindest durch Kollagenfibrillen auch in einem weitgehend plasmafreien Milieu aggregiert werden können.

In diesem Zusammenhang ist auch die Aggregation von einmal sequestrengewaschenen Plättchen mit 10µg Kollagenfibrillen (SSKF) nach Resuspendierung in PFP und in Serum des gleichen Spenders untersucht worden (Abb.19). Während die in PFP rückversetzten Plättchen recht gut aggregieren, vermögen dies die „Serumplättchen“ nicht mehr. Allerdings lässt die entsprechende Aufzeichnung der L.D. einen geringen und zwar linearen Anstieg erkennen, wie er im Born-Apparat für die Adhäsion von Thrombozyten an Kollagenfibrillen typisch ist. Mikroskopische Kontrolluntersuchungen haben diesen Befund bestätigt.

3.1.8. Einfluss der Plättchenalterung und des Verdünnungsmediums auf die Thrombozytenaggregation im Born-Aggregometer

Immer wieder ist bei Untersuchungen von PRP im Born-Aggregometer eine Abhängigkeit der Plättchenaggregation von der Alterung der verwendeten Thrombozyten aufgefallen. Aggregiert man Plättchen in Zitrat-PRP mit Kollagen, so verliert die Aggregation mit zunehmendem Alter des PRP an Intensität. Bei einer An-

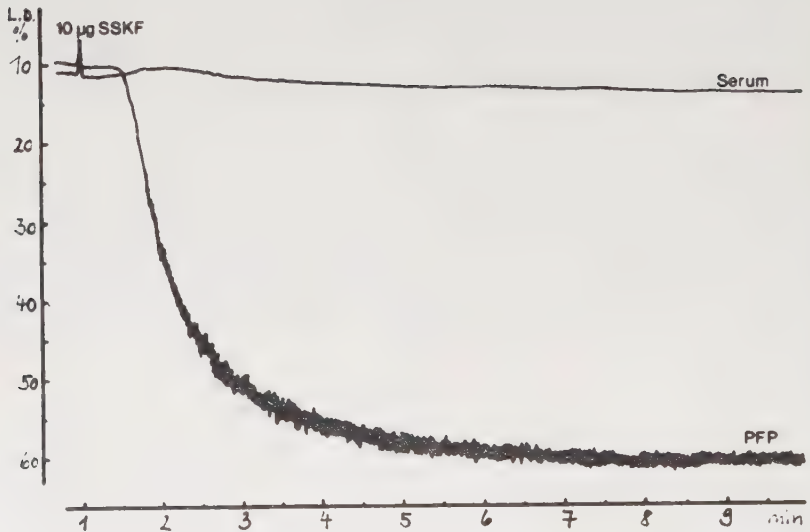
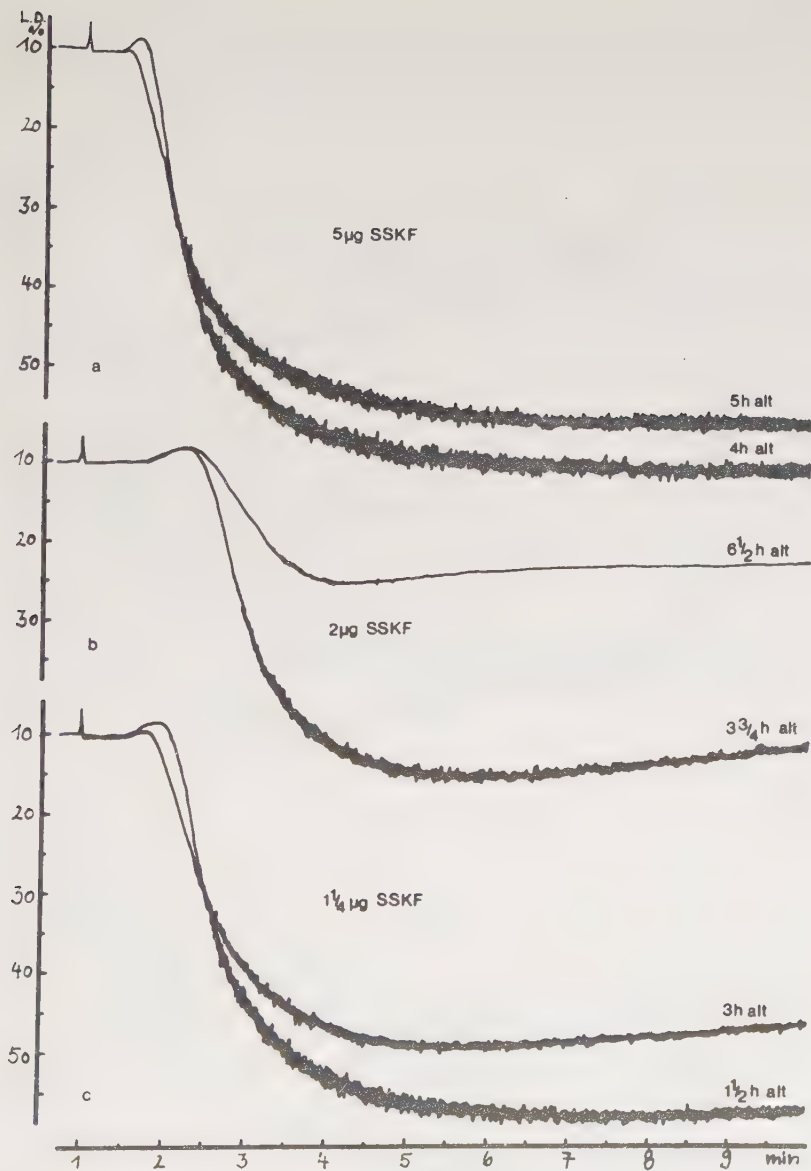


Abb.19: Kollageninduzierte Aggregation sequestrengewaschener Plättchen nach deren Resuspension in identischem PFP bzw. in identischem Serum.

wendung höherer Kollagendosen wie etwa 5µg SSKF (Abb.20a) wird dieser Effekt im Verlauf der ersten fünf Stunden nach der PRP-Gewinnung nicht so deutlich, wie bei der Anwendung niedriger Kollagendosen (Abb.20b,c) im Verlauf der ersten zwei bis drei Stunden. Die Plättchenalterung ist individuellen Schwankungen unterworfen und im übrigen durch die Lagerungstemperatur des PRP zu beeinflussen.

In einem konträren Gegensatz zu den Alterungsbeobachtungen an Zitrat-PRP unter Verwendung von Kollagen als Plättchenaggregans stehen die entsprechenden Beobachtungen an "Calciparin"-

Abb.20a-c: Plättchenalterung in Zitrat-PRP bei der Aggregation mit Kollagendosen von 5 (a), 2 (b) und 1µg (c).



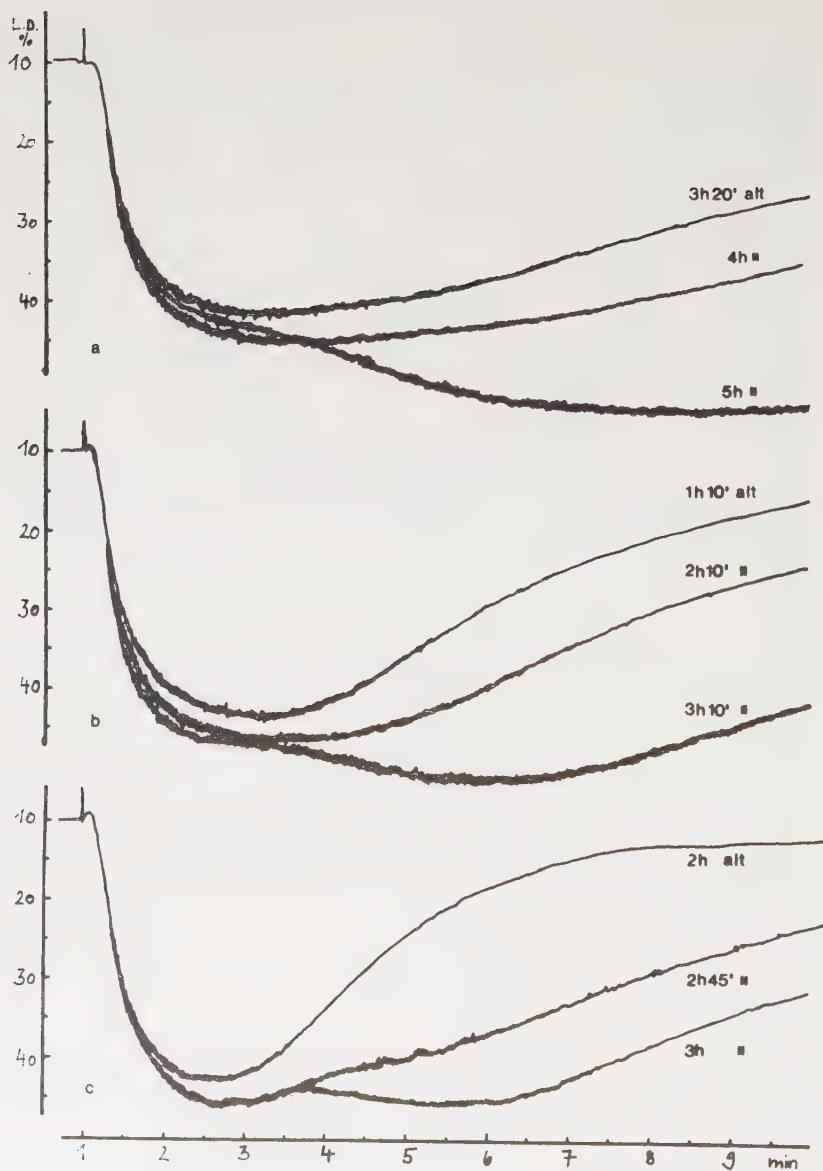
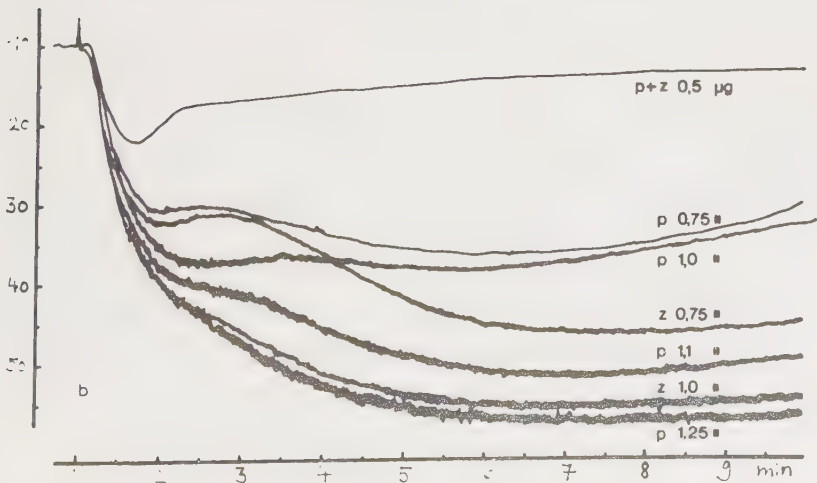
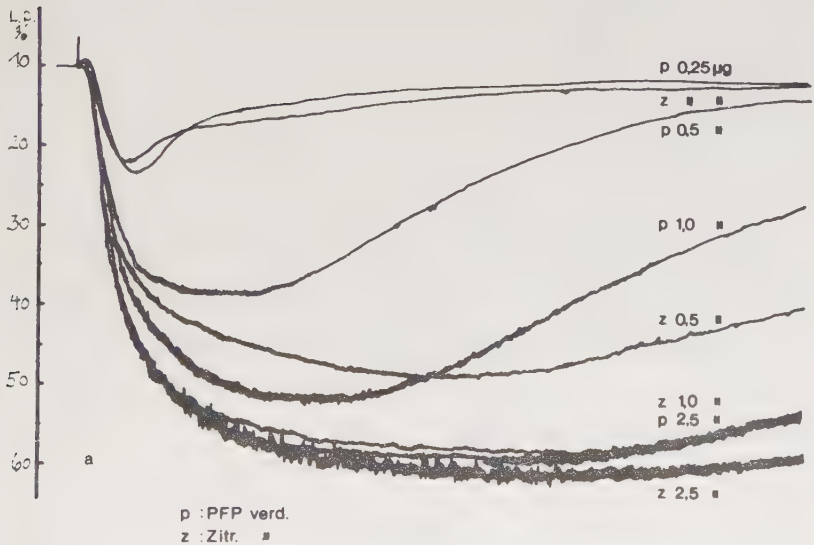


Abb.21a-c: Alterungserscheinung an Plättchen in "calciparinisiertem" PRP dreier verschiedener, gesunder Probanden (a-c) unter Verwendung von je 0,5 μ g ADP als Aggregans.

Abb.22a,b: ADP-induzierte (0,25 - 2,5 μ g) Plättchenaggregation in "calciparinisiertem" (a) und Zitrat-PRP (b), welches jeweils mit PFP und mit Ringerzitratlösung (1ad10) verdünnt ist.



PRP unter Verwendung von ADP. Die Beispiele der Abb.21a-c demonstrieren die ADP-Aggregation ($0,5\mu\text{g}$) von Plättchen verschiedener Altersgrade in »Calciparin»-PRP. Die Intensität der Aggregation nimmt hier mit der Alterung (untersucht bis zu 5 Stunden) der Plättchen zu, unter allmählicher Ausbildung einer »second wave» mit Zunehmen der Alterung.

Die abschliessenden Untersuchungen dieser Serie haben der Frage gegolten, inwieweit Thrombozyten unter Verwendung jeweils gleicher ADP-Dosen (von $0,25$ bis $2,5\mu\text{g}$) unterschiedlich aggregiert werden, je nachdem ob ihre Verdünnung (»Einstellung») auf 200.000 Plättchen pro cmm mit identischem PFP oder aber mit zitratierter (1ad10) Ringerlösung erfolgt ist. Das Blut des ersten Probanden ist mit »Calciparin» (Abb.22a), das des zweiten mit Natriumzitat (Abb.22b) abgenommen. In beiden Fällen aggregieren die ringerverdünnten Blutplättchen besser, vor allem unter mittelstarken ADP-Dosen, als die Thrombozyten in den PFP-verdünnten Ansätzen.

3.2. Die Aggregation von Blutplättchen im PRP durch unterschiedliche Aggregantien:

Kollagenfibrillen - Adrenalin - ADP - »Cialit»

Für Untersuchungen zum Aggregationsverhalten von Blutplättchen, insbesondere auch von pathologischen oder durch Aggregationshemmer thrombopathifizierten Plättchen, ist es ebenso nützlich, lohnend und aufschlussreich vergleichend mit unterschiedlichen Aggregantien zu arbeiten, wie für die Untersuchung ebensolcher Substanzen selbst. Sind im vorangehenden Abschnitt deshalb bereits Kollagen und ADP nebeneinander verwendet worden, so sol-

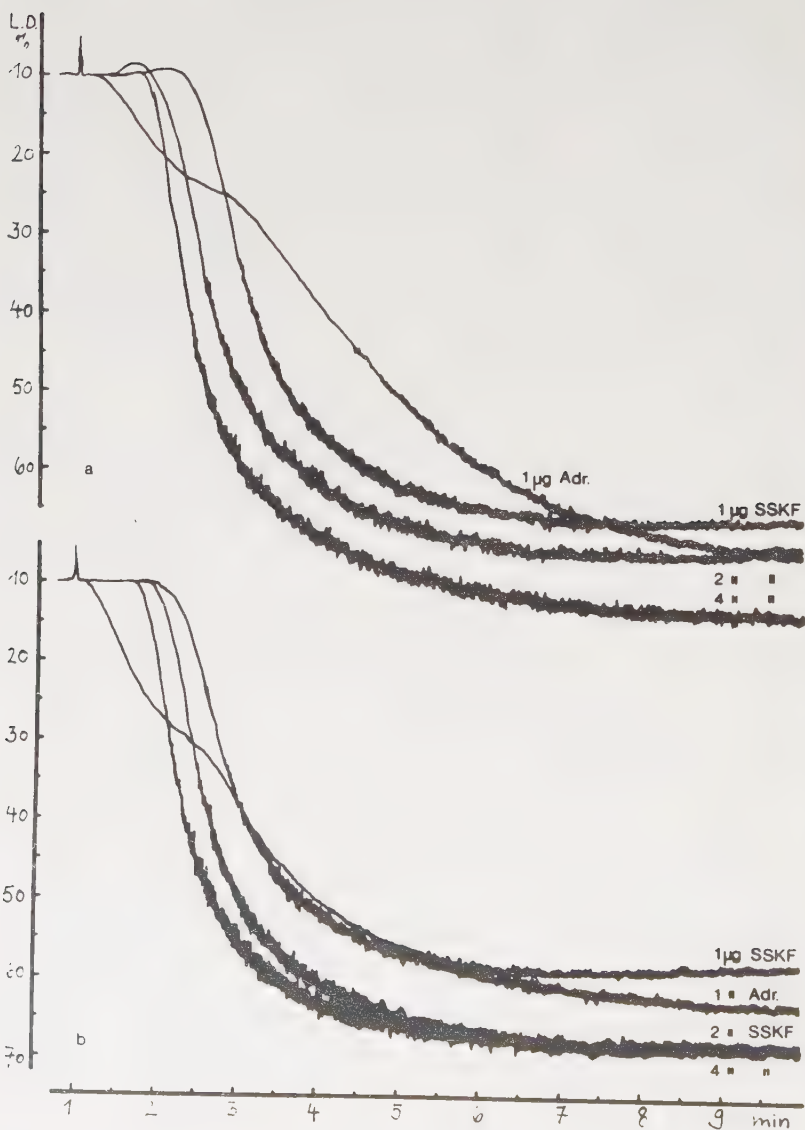
len in einigen folgenden Experimenten Kollagenfibrillen (SSKF), ADP, Adrenalin und »Gialit« als Aggregantien von Blutplättchen in Zitrat-PRP unter Verwendung des Born-Apparates gegenübergestellt werden.

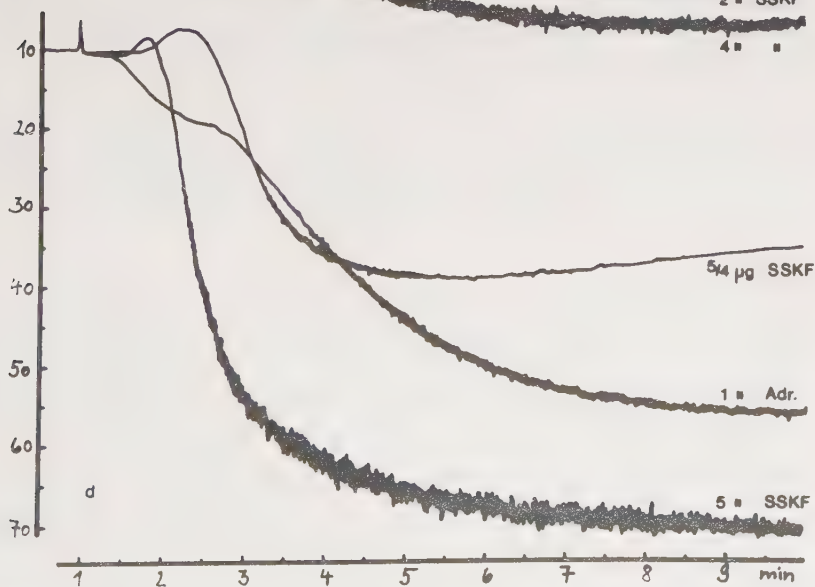
Im ersten Versuch sind PRPn von vier gesunden Kontrollpersonen (Abb.23a-d) unter gleichen Bedingungen mit 1, 2 und 4 μ g bzw. 1 $\frac{1}{2}$ und 5 μ g SSKF sowie mit 1 μ g Adrenalin zur Reaktion gebracht worden. Die Reaktionszeiten zwischen den Plättchen und den Kollagenfibrillen verkürzen sich mit der Mengenzunahme der letzteren. So dauern sie bei der Verwendung von 4 μ g SSKF ca. $\frac{3}{4}$ (b), $\frac{3}{4}$ -1 (a) und 1 (c) Minute, ca. $\frac{3}{4}$ -1 (a), 1 (b) und 1 $\frac{1}{2}$ -1 $\frac{1}{2}$ (c) Minute unter 2 μ g SSKF und schliesslich ca. 1-1 $\frac{1}{2}$ (b), 1 $\frac{1}{2}$ -1 $\frac{1}{2}$ (a) und 1 $\frac{1}{2}$ -1 $\frac{3}{4}$ (c) Minute unter 1 μ g SSKF. Man sieht darüberhinaus, dass die Reaktionszeit nicht nur von der Höhe der verwendeten Kollagendosis abhängt, sondern auch individuell vom jeweiligen PRP.

Die Lichtdurchlässigkeit der PRPn der Abb.23a,c,d verändert sich in der 2.Hälfte der Reaktionszeit für kurze Zeit im Sinn einer kurvenförmigen Abnahme. Dieses als »swelling« der Plättchen bezeichnete Phänomen vermisst man beim PRP der Abb.23b.

Die erreichte Aggregationsintensität der Plättchen, das Aggregationsmaximum (ausgedrückt durch die höchste Zunahme der L.D. des entsprechenden PRP), sowie die Grösse der gebildeten Plättchenaggregate (angedeutet durch die Breite der Kurvenamplitude) nehmen allgemein mit der verwendeten Kollagendosis zu, von Individuum zu Individuum eventuell ein wenig in unterschiedli-

Abb.23a-d: Aggregation der Blutplättchen im Zitrat-PRP vier verschiedener (a,b,c,d) gesunder Kontrollpersonen unter Verwendung von 1, 2 und 4 μ g (a-c) bzw. von 1 $\frac{1}{2}$ und 5 μ g SSKF (d) sowie von 1 μ g Adrenalin (a-d).





cher Ausprägung. Dies gilt in umgekehrtem Sinn für die Desaggregation der Plättchen.

An den Adrenalinkurven der Abb.23 fällt der charakteristische, zweiphasige Verlauf in einer ersten ("first") und einer zweiten ("second") Welle ("wave") auf. Unmittelbar nach Zugabe dieses Aggregans setzt in der "first wave" eine erste Phase der Bildung von Plättchenaggregaten ein. Zwischen der 1. und der 2. Minute nach einem annähernd linear erscheinendem Anfangsverlauf, beginnt sich die Aggregationskurve unter Adrenalin abzufachen, um kurz darauf erneut, als Ausdruck einer zweiten Phase der Aggregatbildung, in einer "second wave" weiterabzufallen. Diese setzt um so früher ein, je grösser die verwendete Adrenalindosis ist (Abb.24).

Eine ausgeprägtere Oszillation der Aggregationskurven beobachtet man unter Adrenalin im Born-Apparat später als unter Kollagen und ADP (vgl. Abb.23 und 24), und vor allem in der Phase der "second wave". Ein "swelling" der Plättchen wie ebenfalls bei der Anwendung von ADP und Kollagen, ist unter Adrenalin im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen nicht registriert oder beobachtet worden.

Während die Beispiele der Abb.23 und der Abb.24 im Aggregationsverhalten der Blutplättchen von fünf verschiedenen PRPn gesunder Probanden unter Kollagen und Adrenalin gewisse Gemeinsamkeiten aufweisen, kann man dies an den Beispielen der Plättchenaggregation mittels ADP weniger feststellen (Abb.24 und 25c: zwei verschiedene PRPn mit 200.000 Plättchen pro cmm; sowie Abb.25a,b und 26: drei verschiedene PRPn mit 300.000 Plättchen pro cmm). Diese Feststellung hat sich bei der ADP-induzierten Plättchenaggregation im Born-Apparat immer wieder ma-

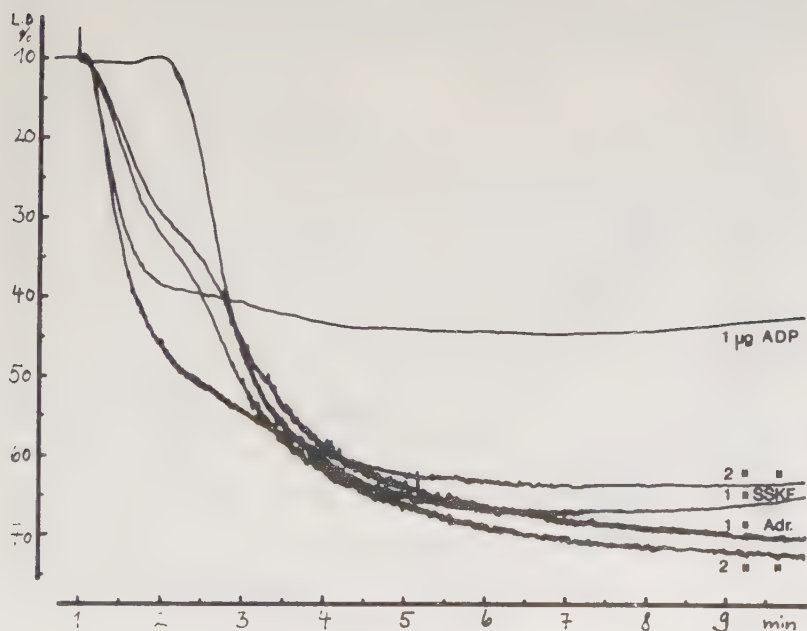


Abb.24: Aggregation von Blutplättchen in Zitrat-PRP unter Verwendung von jeweils 1µg ADP, Adrenalin und SSKF sowie von 2µg ADP und Adrenalin.

chen lassen.

In Abhängigkeit von der ADP-Dosis und der Plättchenzahl pro cmm registriert man bei der Aggregation durch ADP im Born-Apparat ein mehr (z.B. Abb.5c6 u.a.) oder weniger (z.B. Abb. 24 u.a.) ausgeprägtes "swelling" der Plättchen. Allerdings kann es auch fehlen, ähnlich wie bei der Messung der Plättchenaggregation unter Kollagen (z.B. Abb.25a u.a.) Das "swelling" unter ADP folgt unmittelbar auf dessen Zugabe zum PRP und geht sofort in die Aggregationsphase der Plättchen über.

Die Plättchenaggregation durch ADP kann monophasisch (Abb.25a) oder biphasisch (Abb.25b,c) verlaufen, dann ebenfalls mit ei-

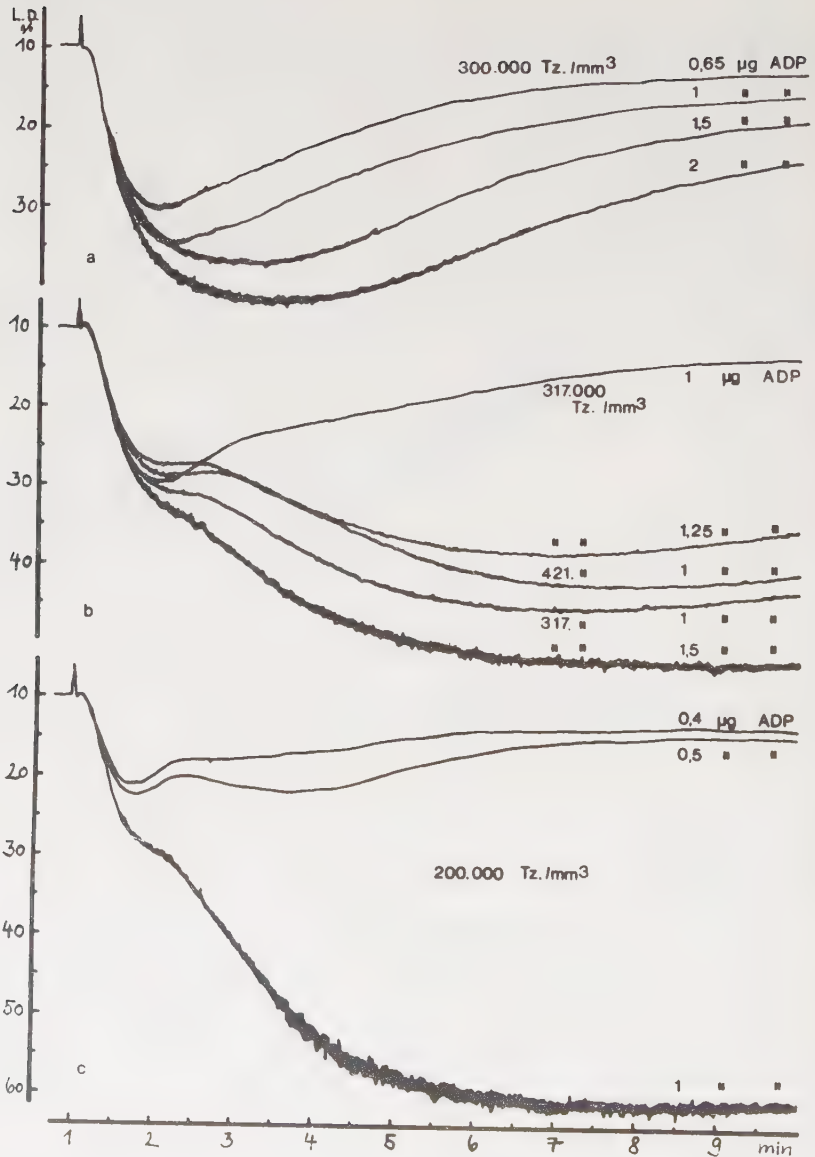


Abb.25a-c: Aggregation von Blutplättchen (a,b: 300.000/cmm, c: 200.000/cmm) in Zitrat-PRP unter Verwendung unterschiedlicher ADP-Dosen - Abhängigkeit der Aggregation und der "second wave" von der Plättchenzahl und der ADP-Dosis.

ner "second wave": Wie nähere Untersuchungen, deren Ergebnisse die Kurven der Abb.25b,c und 26 zeigen, hängt das Auftreten einer "second wave" unter ADP zum einen stark von dessen Dosis zum anderen von der Plättchenzahl pro cmm ab. Der Grad beider Abhängigkeiten schwankt in gleichen Ansätzen von Individuum zu Individuum. Im übrigen erhält man oft ADP-Kurven, in denen der Ansatz der "second wave" geradezu verschluckt zu sein scheint (Abb.24 u.a.), kaum von der "first wave" zu unterscheiden ist und allenfalls geahnt werden kann.

Die Intensität der Plättchenaggregation nimmt ebenfalls mit

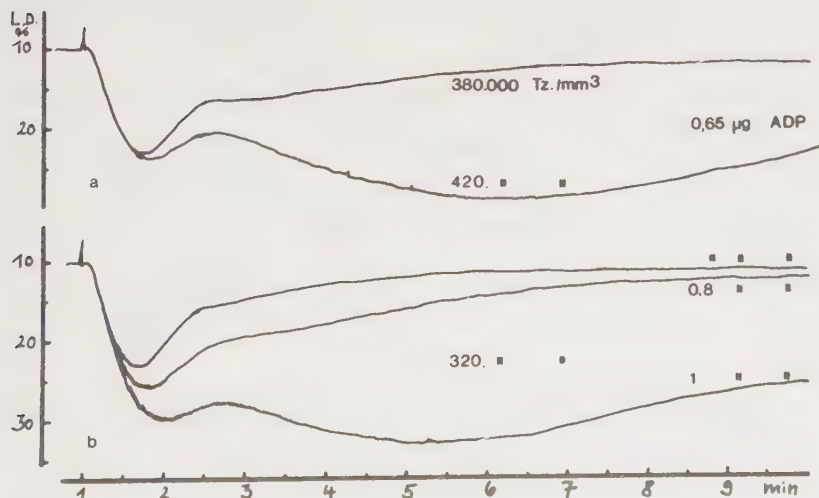


Abb.26a,b: Abhängigkeit der "second wave" von der ADP-Dosis (a) und von der Plättchenzahl/cmm (b).

steigender ADP-Dosierung zu. Im Gegensatz zum Adrenalin zeigen im Born-Apparat die Messungen von ADP-Kurven schon in der "first wave" bei ausreichender ADP-Dosierung Aggregate einer Grösse, die eine Kurvenamplitude entstehen lassen (Abb.25a).

Obwohl diese vergleichenden Aggregationsuntersuchungen nur angestellt worden sind, um einen Überblick zu gewinnen, genügen sie doch der Verdeutlichung, dass Kollagen, ADP und Adrenalin typische Besonderheiten in ihrer plättchenaggregierenden Wirkung aufweisen.

Als viertes Beispiel und unphysiologisches Aggregans ist schliesslich noch "Cialit" getestet worden. Auf dessen Potenz Blutplättchen zu aggregieren ist im Zusammenhang dieser Arbeit bei Konservierungsversuchen gestossen worden. "Cialit" findet nämlich wegen seiner fungi- und bakteriziden Wirkung für die Haltbarmachung von Seren u.ä. in Verdünnungen von 1:5000 und 1:10.000 Verwendung. Diese Verdünnungen entsprechen "Cialit"-Dosen von 100 - 200µg/ml.

Wie die Untersuchungen der Abb.27a,b zeigen, unterscheidet sich möglicherweise die Cialitempfindlichkeit der Blutplättchen individuell stärker. Während die Thrombozyten des Zitrat-PRP der Abb.27a erst unter 50µg "Cialit" aggregieren, genügen dazu beim PRP der Abb.27b bereits 20µg. Obwohl identisches PRP im Versuch der Abb.27a unter 2µg SSKF ein deutliches "swelling" zeigt, fehlt dies unter "Cialit".

Bei Verwendung dieses unphysiologischen Aggregans geht der Plättchenaggregation, wie sie der Born-Apparat misst, eine Reaktionszeit voraus, welche an die unter Kollagen erinnert und deren Dauer ebenfalls von der Dosis des Aggregans abhängt. Ei-

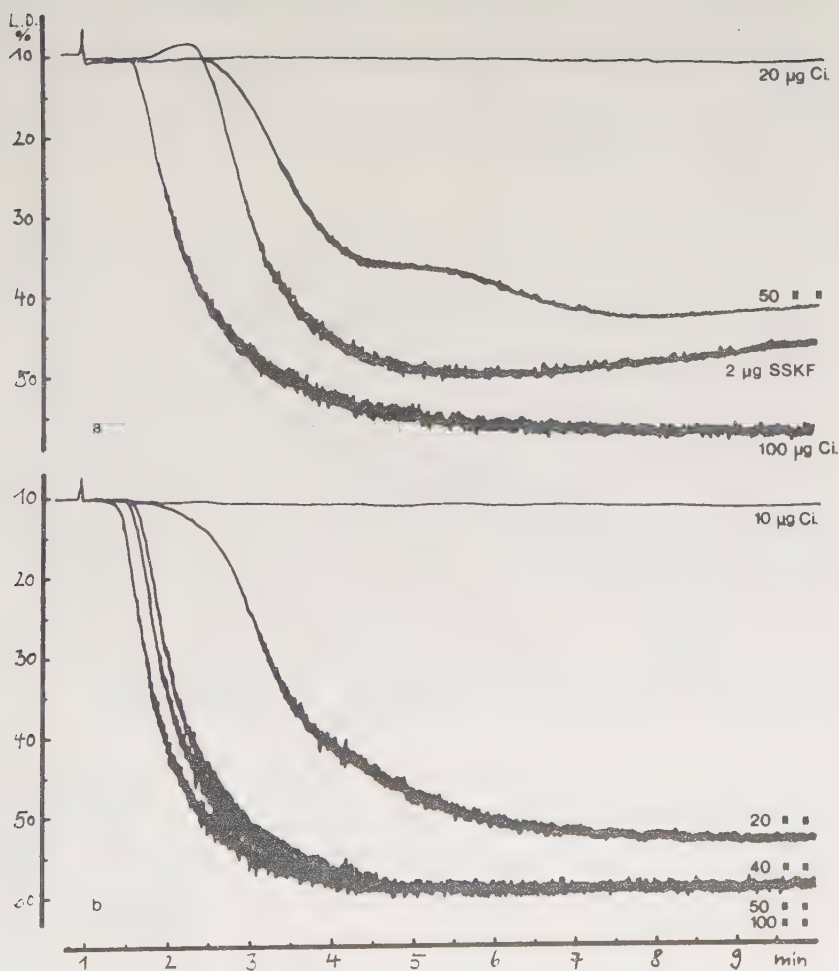


Abb.27a,b: Aggregation der Blutplättchen zwei verschiedener Zitrat-PRP (a,b) mit "Cialit" als Aggregans.

ne derartige Reaktionszeit, die durch das Gleichbleiben der L.D. charakterisiert ist, fehlt den beiden Aggregantien ADP und Adrenalin.

Im übrigen lässt die Aggregation von Blutplättchen durch »Cialit« besonders gut erkennen, dass die Überschreitung einer »niedrigsten maximalaggregierenden Dosis« (s.a.S.33) das im Born-Apparat messbare Endergebnis einer Plättchenaggregation zwar deutlich schneller erreichen lässt, aber kaum verbessert (Abb.27b).

Die beiden letzten Untersuchungen dieser Reihe wenden sich nocheinmal der Plättchenaggregation durch Kollagenfibrillen (SSKF) zu. In Übereinstimmung mit dem letzten »Cialit«-Versuch hat sich auch unter Kollagen gezeigt, dass die Überschreitung einer kleinsten oder niedrigsten maximalaggregierenden Dosis - $2\mu\text{g}$ SSKF im Fall der Abb.28 - die Aggregation normaler Blutplättchen, wie sie der Born-Apparat misst, weniger in Hinblick auf das Endergebnis beeinflusst, als auf die Verkürzung der Zeit, in welcher letzteres erreicht wird. So verkürzt in diesem Beispiel die Erhöhung der Kollagendosis die Reaktionszeit zwischen Plättchen und Kollagen von etwas über 60 ($2\mu\text{g}$ SSKF) auf etwa 35 Sekunden ($10\mu\text{g}$ SSKF).

Im Versuch, dessen Ergebnis Abb.29a,b wiedergibt, sind die PRPn vier verschiedener gesunder Kontrollpersonen mit $1\mu\text{g}$ (b) und $2\mu\text{g}$ (a) Kollagen aggregiert. Man sieht daran gut, dass eine Erhöhung der Kollagendosis Unterschiede im Aggregationsverhalten individuell verschiedener Plättchen nivelliert, Unterschiede, welche unter niedrigeren Dosen des Aggregans noch recht deutlich sind.

Schliesslich sei noch besonders auf eine Beobachtung dieses Abschnittes hingewiesen, die bei den vergleichenden Untersuchungen zur Plättchenaggregation durch ADP, Adrenalin und Kollagen aufgefallen ist:

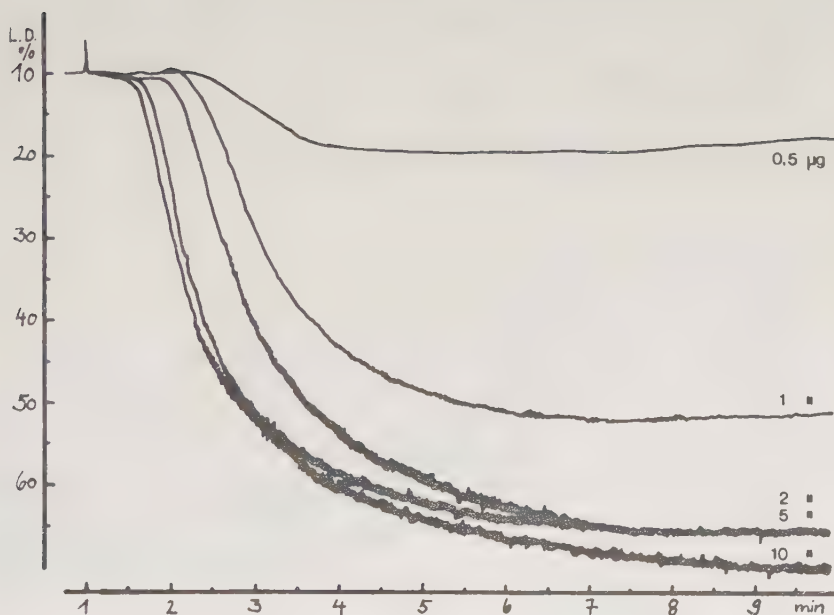


Abb.28: Aggregation von Blutplättchen in Zitrat-PRP unter Verwendung unterschiedlicher Kollagendosen (0,5, 1, 2, 5 und 10µg SSKF).

Die Reaktionszeit der Kollagenansätze lässt sich immer wieder gut mit dem zeitlichen Ablauf der „first wave“ der Plättchenaggregation unter Adrenalin (Abb.23a-d, Abb.24) und ADP (Abb. 22) korrelieren.

3.3. Die Wirksamkeit unterschiedlicher Kollagenpräparationen auf Blutplättchen im PRP

Bei der Inangriffnahme der vorliegenden Arbeit bestand ursprünglich vor allem der Wunsch nach einer gut geeigneten Kollagenpräparation, die für die Untersuchung hämostaseologischer Fra-

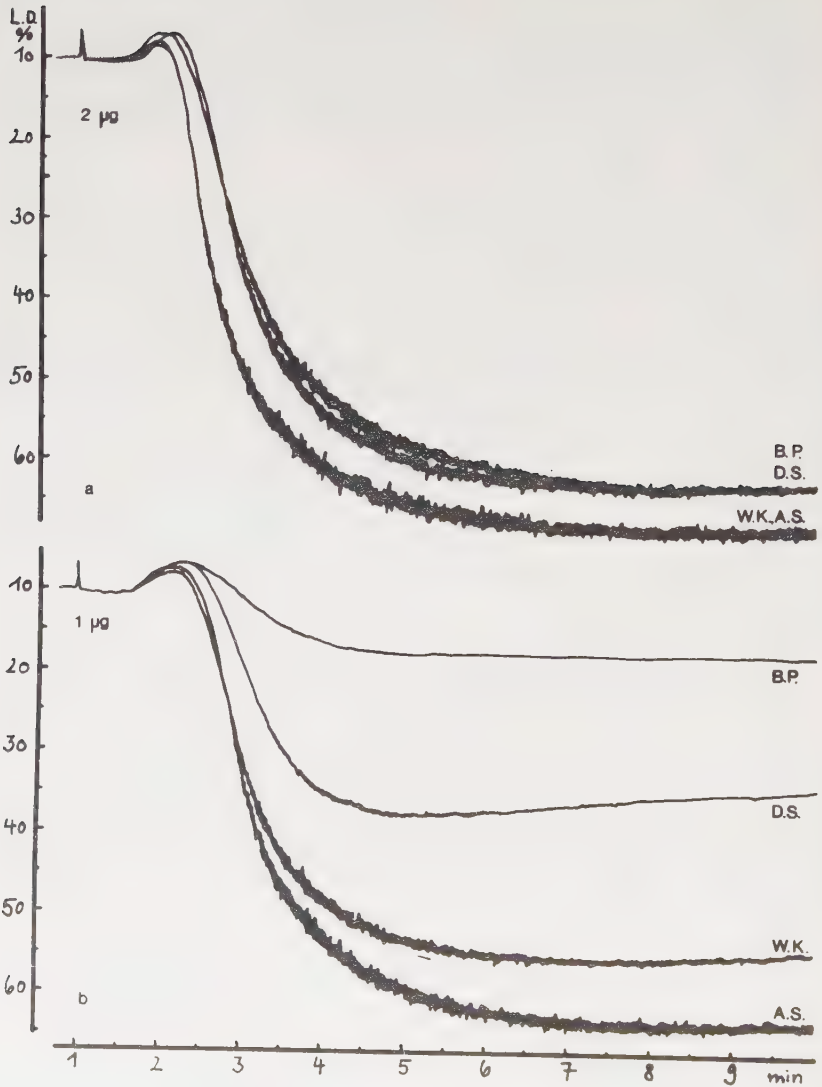


Abb.29a,b: Aggregation von Thrombozyten vier verschiedener PRPn gesunder Kontrollpersonen unter 2 (a) und 1 µg (b) SSKF.

gestellungen vielseitig verwendbar sein sollte. Dazu sind Untersuchungen der Art angestellt worden, wie sie dieser Abschnitt enthält.

3.3.1. Die plättchenaggregierende Wirksamkeit suspendierter Kollagene

Als Ausgangsmaterial für die Herstellung erster Kollagenpräparate sind suspensible Partikel aus Kollagenfibrillen (SKP) der Pferdesehne und säurelösliche Kollagene der Kalbshaut (SLK) herangezogen worden (s.a.S. 15).

Die aggregierende Wirkung dieser beiden Kollagentypen, in zitratisierter (1ad10) Ringerlösung als SKP und SLK(RiZ) suspendiert, auf Blutplättchen in Zitrat-PRP demonstrieren die entsprechenden Kurven der Abb.30. Die geringere Wirksamkeit der Suspension säurelöslichen Kalbshautkollagens gegenüber der Suspension kollagener Fibrillenschaum-Partikel ist daraus recht deutlich zu ersehen.

Um die Stabilität der SKP zu verbessern, sind die Kollagenfibrillen in den nächsten Aggregationsansätzen sauer suspendiert (in aq.bidest. pH3) als SSKF („sauer suspendierte Kollagenfibrillen“) verwendet worden. Das Ergebnis eines Vergleichs von SKP und SSKF ist ebenfalls der Abb.30 zu entnehmen. Danach aggregieren 5µg der in aq.bidest. sauer suspendierten Kollagenfibrillen deutlich besser als deren 20fache Menge, nämlich 100µg, suspendiert in annähernd neutraler Ringerzitratlösung. An der 100µg-SSKF-Kurve der Abb.30 fällt im übrigen die extreme Verkürzung der Reaktionszeit zwischen Blutplättchen und Kollagenfibrillen auf.

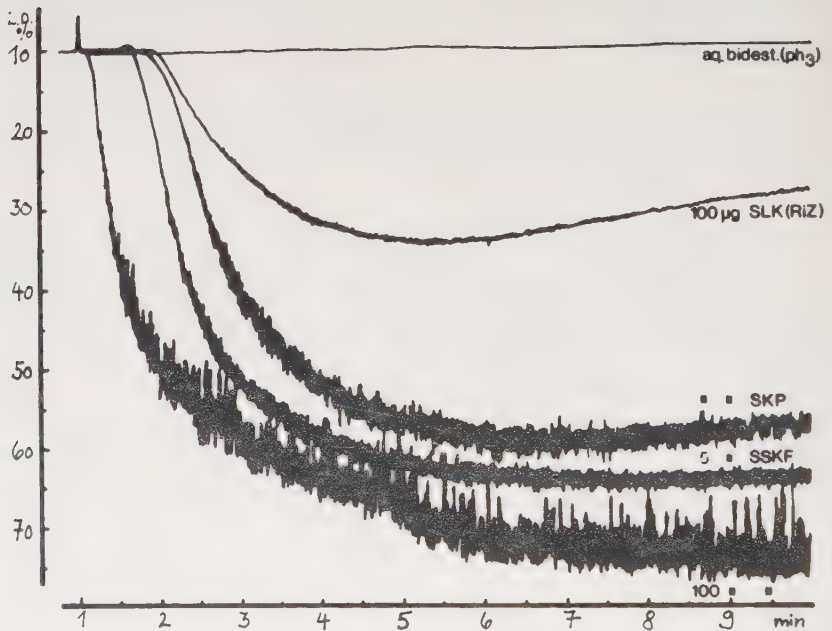


Abb.30: Aggregation von Blutplättchen in Zitrat-PRP unter Verwendung verschiedener, suspendierter Kollagene als Aggregantien.

Ein weiterer Aggregationsansatz, dem zur Kontrolle 50µl aq.bi-dest.(ph3) zugesetzt worden ist, zeigt keine im Born-Apparat messbare Veränderung in der L.D..

In diesem Zusammenhang hat es auch interessiert, inwieweit die Na^+ , K^+ , Cl^- und Ca^{++} Ionen der Ringerlösung die Stabilität der Suspension kollagener Fibrillen beeinflussen. Dazu ist SSKF mit SSKF(RiZ) (s.S.15) in seiner plättchenaggregierenden Wirksamkeit verglichen worden (Abb.31). 5µg Kollagen in der ersteren Suspensionsform aggregieren in dieser Untersuchung, gemessen an der Reaktionszeit besser, gemessen am Aggregati-

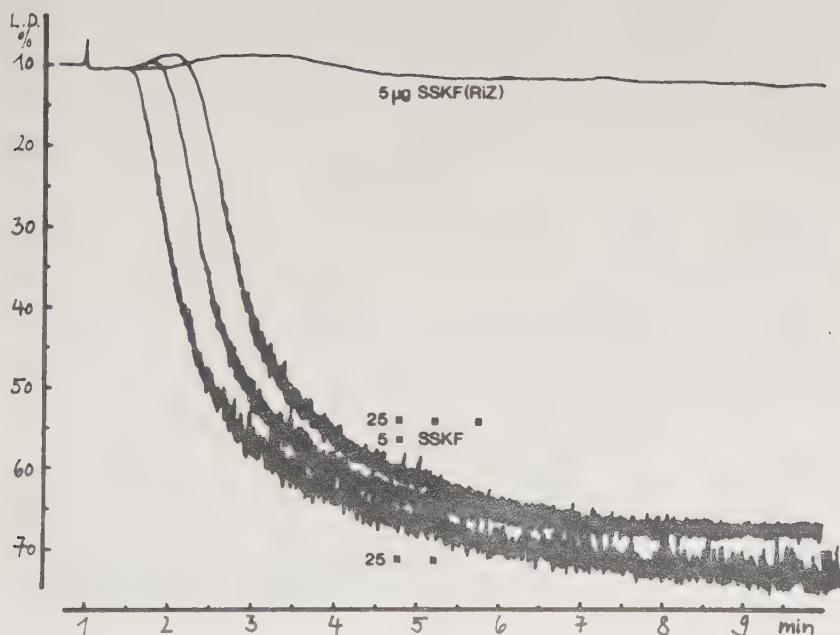


Abb.31: Aggregation von Blutplättchen in Zitrat-PRP durch Kollagensuspensionen unterschiedlicher Ionenstärke.

onsmaximum etwa gleich gut wie 25µg der letzteren. Setzt man der SSKF NaCl u.a. 0,9% zu (SSKF(NaCl)), so werden die aggregierenden Eigenschaften der Suspension kaum beeinträchtigt.

3.3.2. Die plättchenaggregierende Wirksamkeit gelöster Kollagene

Anschließend sind säurelösliche Kollagene, gelöst in aq.bi-dest.(ph3), anhand ihrer plättchenaggregierenden Eigenschaften mit entsprechend suspendierten Kollagenfibrillen verglichen worden.

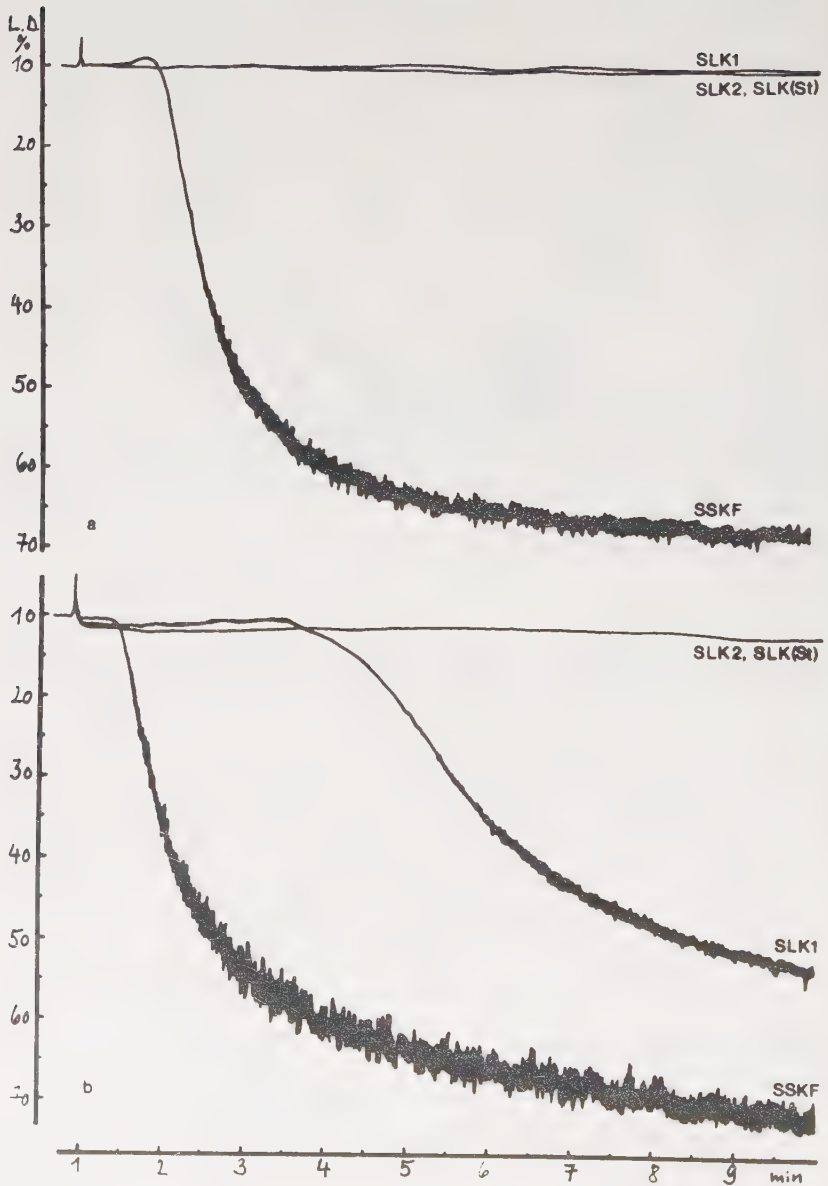


Abb.32a,b: Vergleich der plättchenaggregierenden Wirkung verschiedener sauer gelöster bzw. suspendierter Kollagene in Dosen von 5 μ g (a) und 50 μ g (b).

Wie die Messkurven zeigen, hat die Dosis von 5 μ g SSKF (Abb.32a) sehr gut, maximal, aggregiert. Gleiche Mengen von SLK1, SLK2 und SLK(St) (s.a.S.15) haben dagegen keine im Born-Apparat messbare Wirkung gezeigt.

Erhöht man die Dosen der letztgenannten Kollagenpräparationen um das zehnfache auf 50 μ g, so aggregiert SLK1 recht gut die verwendeten Blutplättchen, während SLK2 und SLK(St) auch in dieser Dosierung noch keine messbare Aggregation auslösen (Abb.32b).

An der Aggregation unter 50 μ g SLK1 fällt die vergleichsweise langdauernde Reaktionszeit von $2\frac{1}{2}$ - $2\frac{3}{4}$ Minuten zwischen Plättchen und Kollagen besonders auf, wogegen die gleichen Plättchen unter identischen Bedingungen mit 50 μ g SSKF nur $\frac{1}{2}$ Minute bis zum Beginn ihrer Aggregation reagieren.

3.3.3. Die Phasen der Reaktion von Blutplättchen mit sauer-suspendierten Kollagenfibrillen (SSKF) im PRP

An dieser Stelle ist zu erwähnen, dass gerade im Zusammenhang mit den Untersuchungen dieses Abschnittes während interessierender Phasen der Kollagen-Plättchenreaktion aus der Messküvette des Born-Apparates synchron zur Aggregometrie bei Bedarf PRP in 10 oder 20 μ l Proben zur Beurteilung im Phasenkontrastmikroskop entnommen worden ist (s.S.13). Bei solchen Gelegenheiten sind die Mikrofotos der Abb.34-38 entstanden.

Abb.33 gibt an, in welcher Phase der Plättchen-Kollagenreaktion die PRP-Proben für die jeweiligen Präparate der Abb.34-

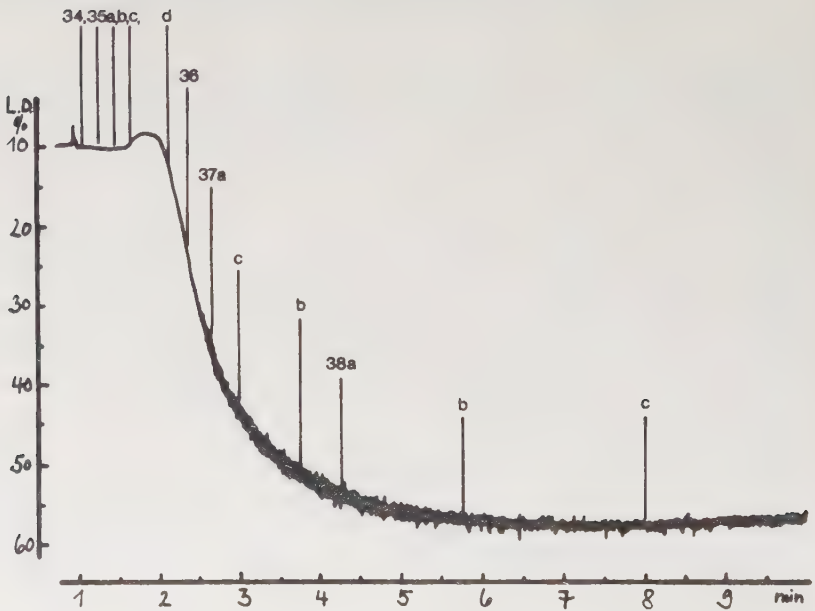


Abb.33: Schema zu Abb.34-38 - Angabe der Entnahmepunkte der jeweiligen PRP-Proben.

38 aus der Aggregationsküvette des Born-Apparates entnommen worden sind.

3.3.4. Die plättchenaggregierende Wirksamkeit modifizierter SSKF im PRP - Die Lagerungsstabilität der SSKF

Als wichtiges Ergebnis der bisherigen Experimente hat sich die besonders gute Aktivität einer saueren Suspension kollagener Fibrillen (SSKF) als kollagenes Aggregans für Blutplättchen herausgestellt.

Um über diese SSKF weitere Aufschlüsse in Hinblick auf ihre

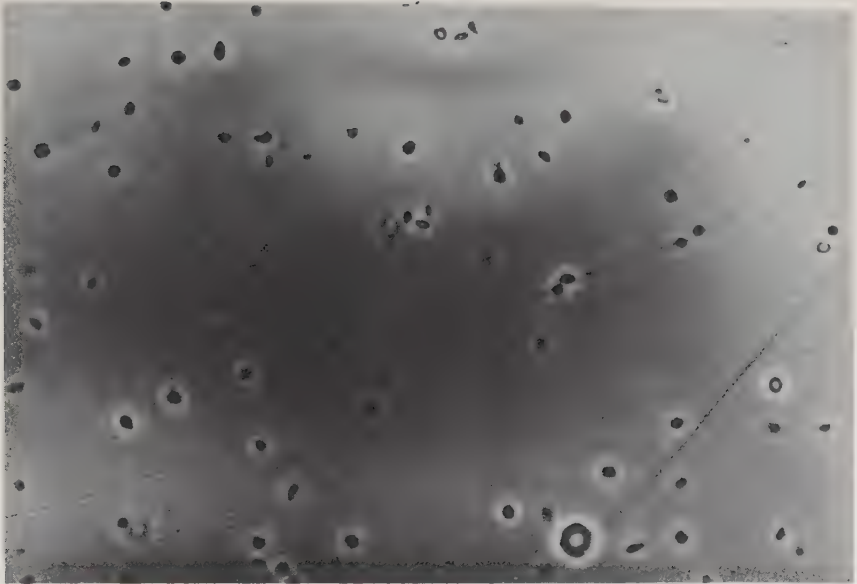


Abb.34: Kollagenfibrillen (SSKF) unmittelbar nach der Zugabe zu PRP - Einzelliegende Thrombozyten, einzelner Erythrozyt am unteren Bildrand rechts.

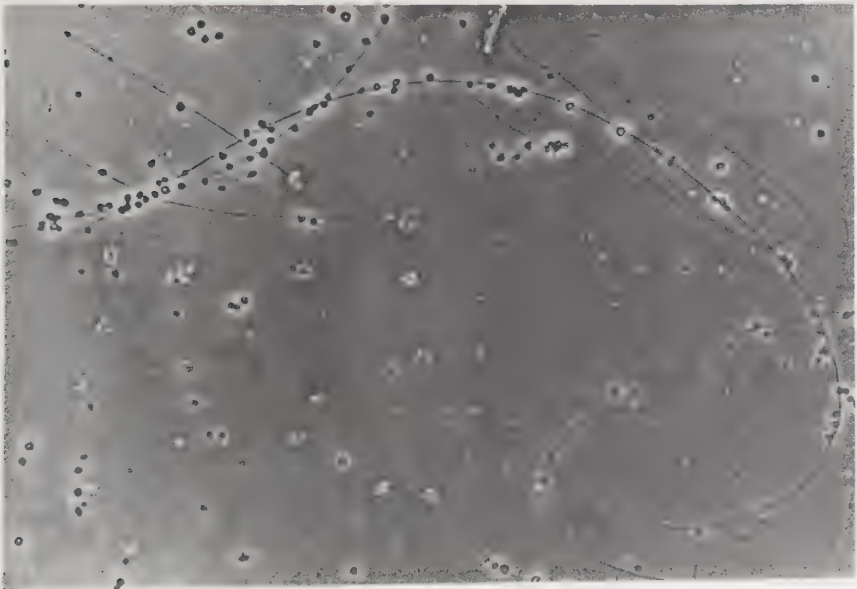


Abb.35a: Beginnende Adhäsion von Thrombozyten an Kollagenfibrillen (SSKF) im PRP.

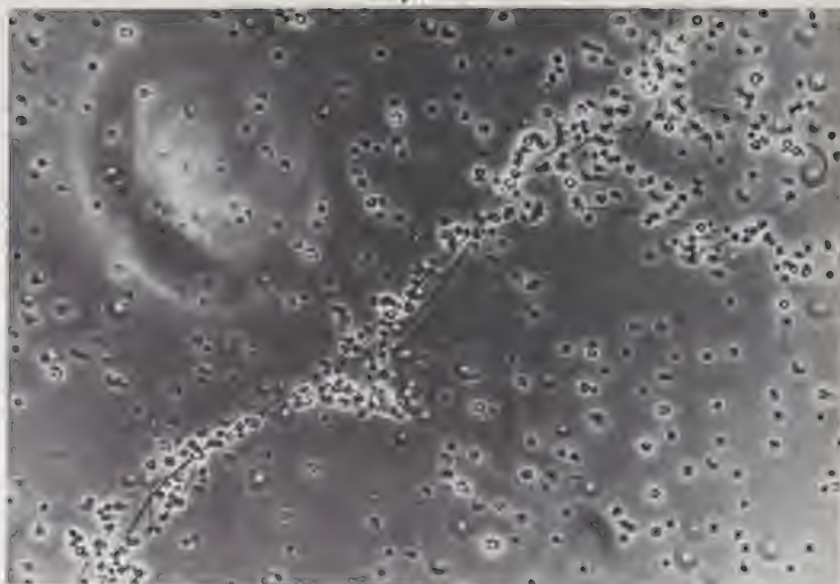


Abb.35b: Fortgeschrittene Adhäsion von Thrombozyten an Kollagenfibrillen (SSKF) im PRP.

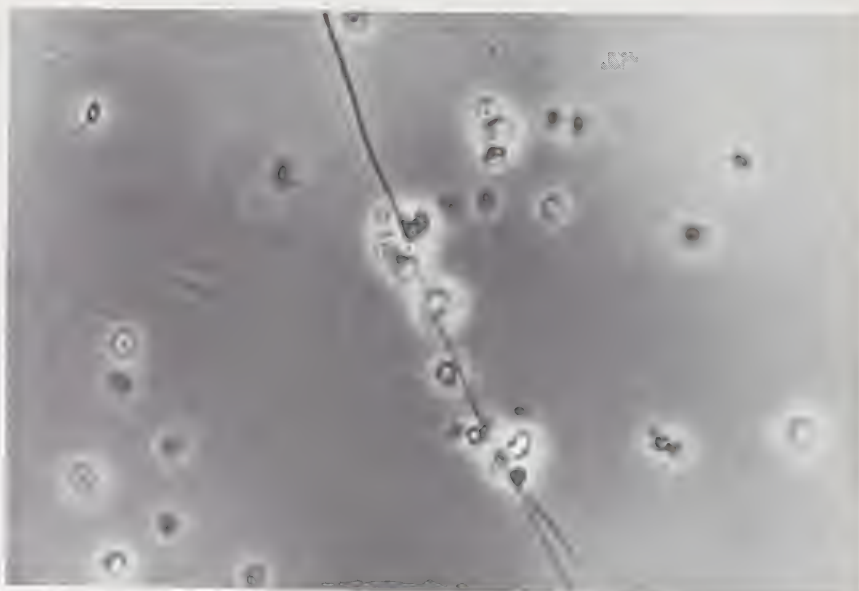


Abb.35c: Adhäsion einiger Thrombozyten an einer Kollagenfibrille (SSKF) im PRP bei stärkerer Vergrößerung - Beginnende Aggregation.

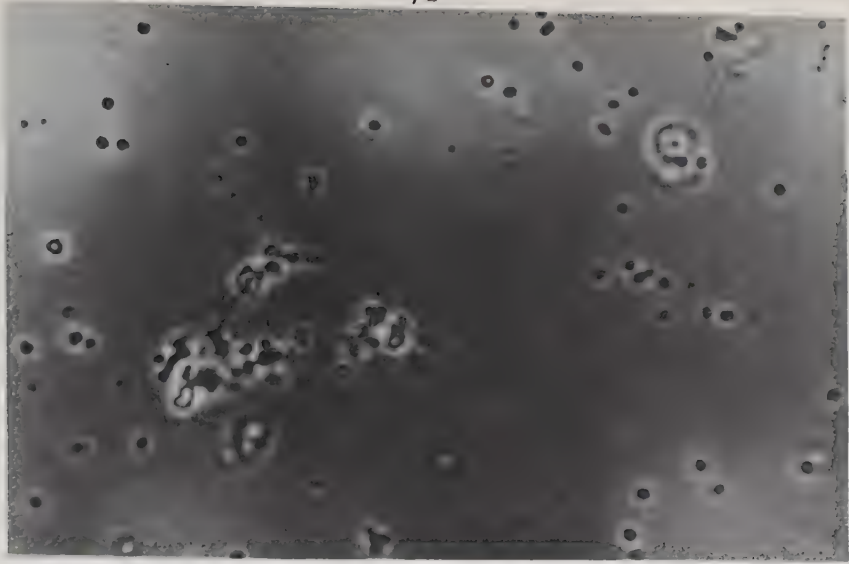


Abb.35d: Thrombozytäre Adhäsion und Aggregatbildung an Kollagenfibrillen im PRP.



Abb.36: Plättchenreiches Plasma (PRP) mit mehreren, kollagen-induzierten (SSKF), reversiblen Thrombozytenaggregaten in der Übersicht.

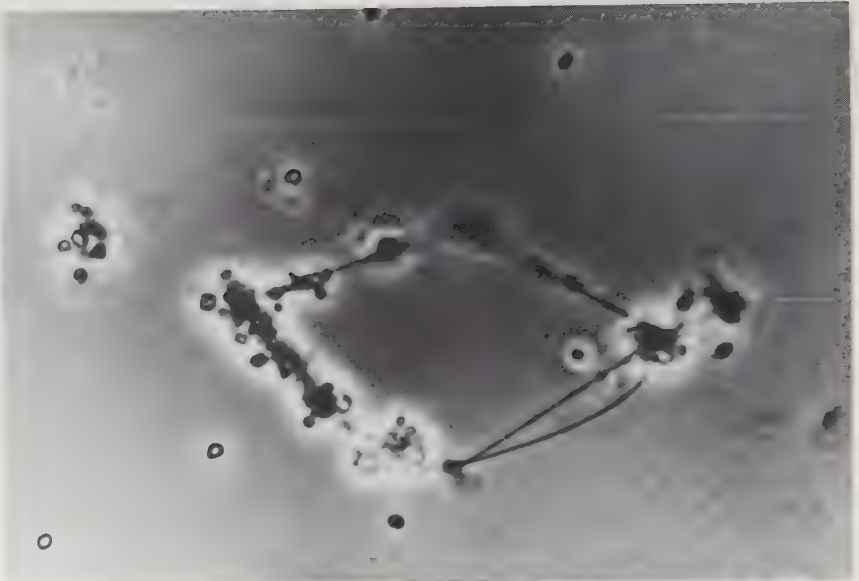


Abb.37a: Beginnende "visköse Metamorphosen", Übergang: reversibler zu irreversibler, kollageninduzierter (SSKF) Aggregation von Thrombozyten im PRP.

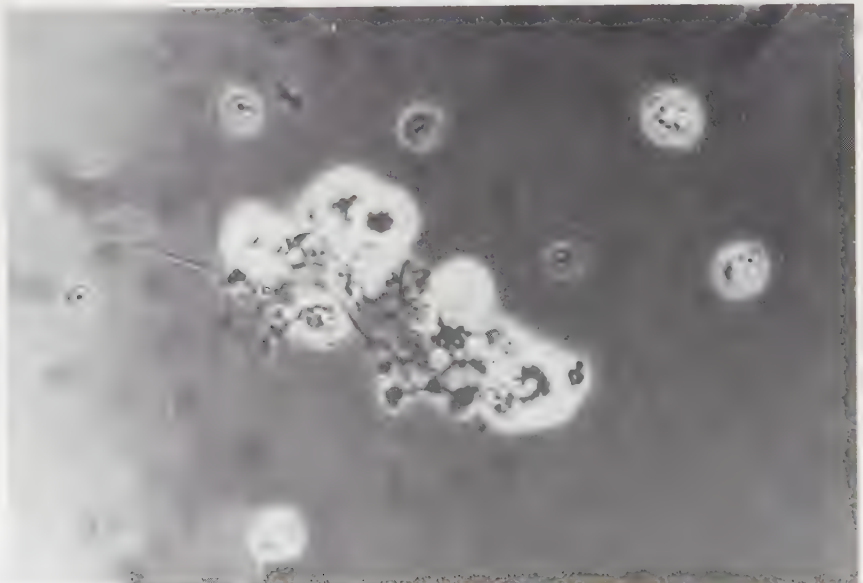


Abb.37b: Durch säurelösliches Kollagen (SLK) in PRP induziertes Thrombozytenaggregat - Das lösliche, monomere Kollagen hat sich im Milieu des PRP fibrilloid rekonstituiert.

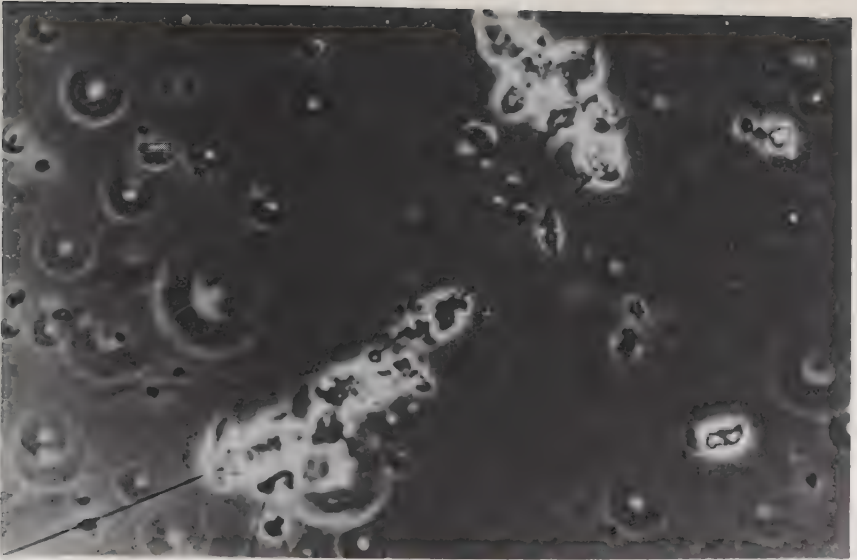


Abb.37c: Zwei kleine, bereits irreversibel durch Kollagenfibrillen (SSKF) induzierte Thrombozytenaggregate im PRP.

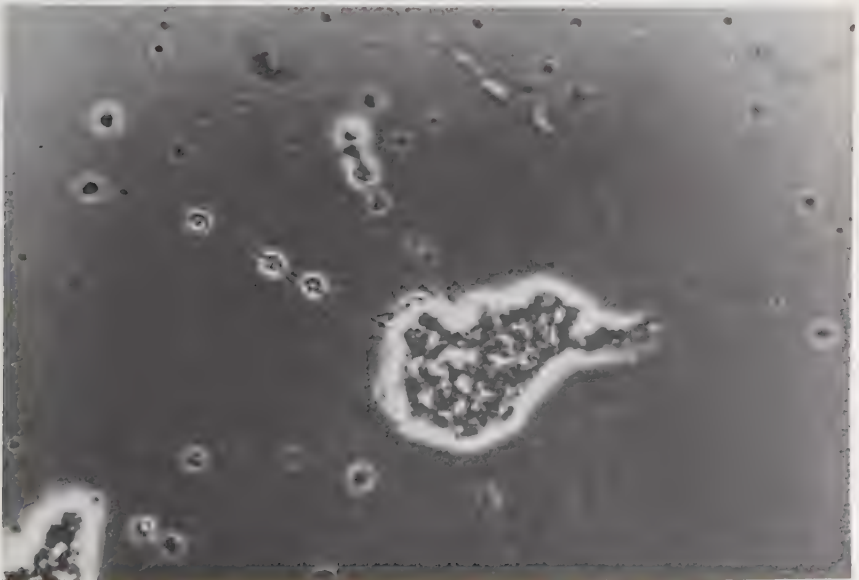


Abb.38a

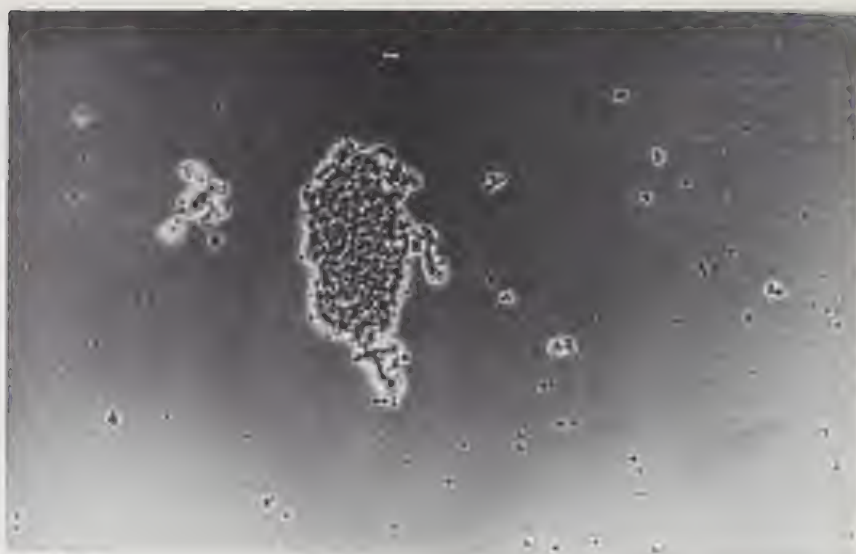


Abb.38b



Abb.38c

Abb38a-c: Unterschiedlich grosse, irreversible Thrombozyten-aggregate nach abgeschlossener kollageninduzierter (SSKF) Plättchenaggregation in PRP.

plättchenaggregierenden Eigenschaften zu gewinnen, sind modifizierte Präparationen der SSKF untersucht worden (s.Tab.4 S. 15).

Die Reaktion von Blutplättchen im Born-Apparat mit dem Überstand zentrifugierter, sauer suspendierter Kollagenfibrillen (SSKF(Ü)) illustriert Abb.39. Dazu ist eine nicht sehr konzen-

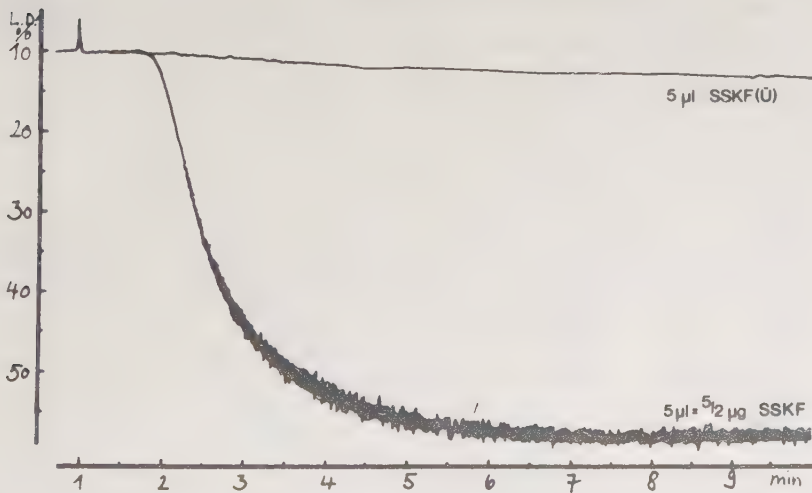


Abb.39: Vergleich der aggregierenden Wirkung von 2 $\frac{1}{2}$ µg SSKF und deren Überstand nach Zentrifugation (SSKF(Ü)) auf Blutplättchen im Zitrat-PRP.

trierte Suspension verwendet worden, die 2 $\frac{1}{2}$ µg Kollagenfibrillen pro ml enthalten hat. Deren gutes Aggregationsvermögen ist nach entsprechender Zentrifugation (2x60 Minuten bei 4000 g) verloren gegangen.

Zentrifugiert man eine konzentrierte Suspension, z.B. mit 10 oder mehr µg pro ml in gleicher Weise, so registriert man bei Verwendung des Überstands im Vergleich mit der zugehörigen

SSKF noch eine abgeschwächte Aggregation der Plättchen. Trotzdem findet man auch in dieser Präparation von SSKF(Ü) bei Kontrolle unter dem Phasenkontrastmikroskop keine Fibrillen. U.a. findet man im Experiment eine charakteristische Abhängigkeit der sekundären und höheren Struktur des Skleroproteins Kollagen von Temperatureinflüssen (103). In den beiden nächsten Untersuchungen sind aus diesem Grund unterschiedlich - nämlich in feuchtem (Abb.40) und trockenem (Abb.41) Zustand - erhitzte Kollagenfibrillen auf ihre aggregierende Wirksamkeit gegenüber Blutplättchen untersucht worden.

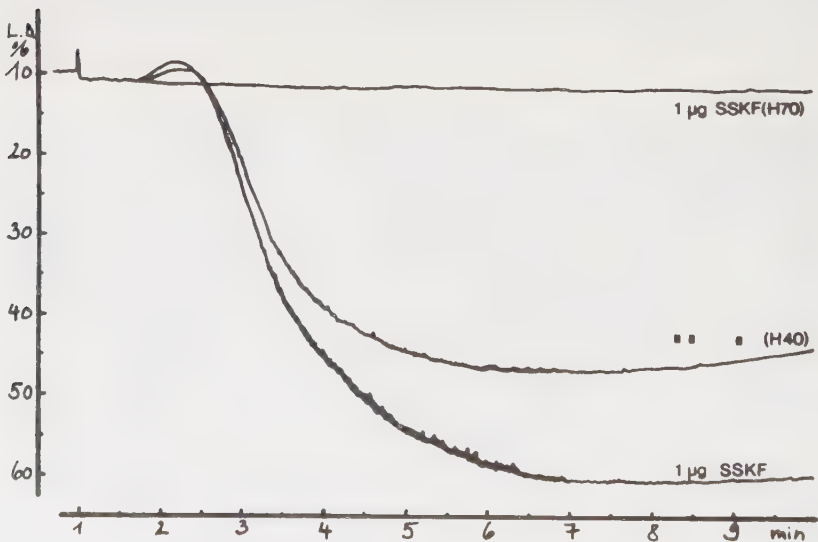


Abb.40: Aggregation von Blutplättchen in Zitrat-PRP durch erhitzte, saure Suspensionen kollagener Fibrillen.

Während eine Erwärmung der feuchten Fibrillen auf 40°C (s.S. 15) die Aggregationskraft von 1µg einer derartigen SSKF(H40) bereits etwas beeinträchtigt, aggregieren die gleichen Kolla-

genfibrillen vorher einer Temperatur von 70°C ausgesetzt als SSKF(H70) in gleicher Dosis die Plättchen überhaupt nicht mehr (Abb.40).

Im Gegensatz dazu verändert eine Erhitzung der Kollagenfibrillen auf 140°C (SSKF(T140)) deren plättchenaggregierenden Eigenschaften sehr viel weniger (Abb.41), vorausgesetzt das Kolla-

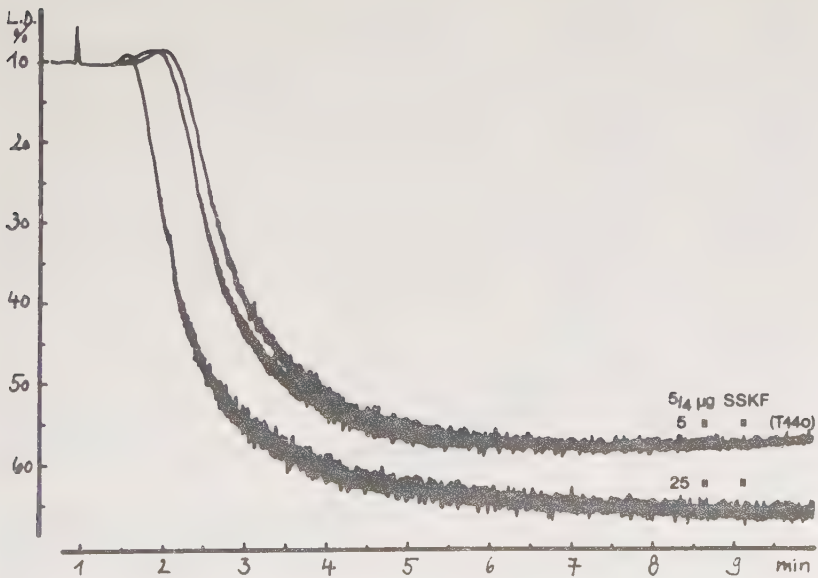


Abb.41: Aggregation von Blutplättchen in Zitrat-PRP durch saure Suspensionen trocken erhitzter (SSKF(T140)) und unerhitzter (SSKF) kollagener Fibrillen.

gen ist vor und während seiner Erhitzung trocken geblieben. Verglichen mit der SSKF aus unerhitztem Kollagen ist in den entsprechenden Ansätzen eine vierfache Menge an SSKF(T140) benötigt worden, um eine etwa gleichstarke Plättchenaggregation zu erreichen.

Bei der Arbeit im klinischen Labor kommt der Haltbarkeit eines Testreagens praktische Bedeutung zu. Deshalb ist einem möglichen Aktivitätsverlust der SSKF während ihrer Lagerung zwischen 0° und 4°C stets besondere Aufmerksamkeit geschenkt worden. Am Beispiel der Abb.42 demonstrieren entsprechende Kurven die

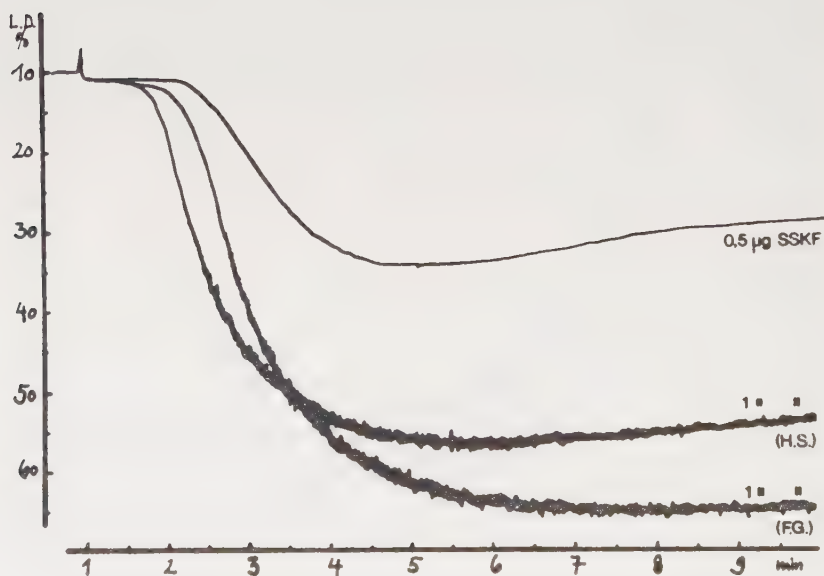


Abb.42: Aggregation von Blutplättchen in Zitrat-PRP durch unterschiedliche Dosen von ein Vierteljahr alter SSKF.

Aggregation von Blutplättchen im Born-Apparat durch drei Monate alte SSKF. Selbst $\frac{1}{2}\mu\text{g}$ von deren Kollagenfibrillen taugen noch zu einer zwar schwachen, aber frischer SSKF äquivalenten Aggregation. Im übrigen hat sich die gute Haltbarkeit der bei 4°C gelagerten SSKF über mehr als ein Vierteljahr immer wie-

der bestätigt.

3.3.5. Die Wirkung von BrCN-Peptiden des Kollagens auf die Plättchenaggregation

Die letzten Experimente dieses Abschnitts haben im Born-Apparat die Wirkung von durch BrCN-Spaltung gewonnenen Kollagenpeptiden (SLK(BrCN)) auf Blutplättchen untersucht.

Die Messung einer Reaktion von Plättchen mit 20µg der SLK(BrCN) zeigt keine Veränderung der L.D. (Abb.43). Die Zugabe von 5µg SSKF etwa 6½ Minuten nach dem Beginn der Reaktion zwischen Plättchen und 20µg SLK(BrCN) im Born-Apparat führt zu einer unbeeinträchtigten Aggregation, deren Kurve mit den Messkurven der zugehörigen Leerwerte sehr gut übereinstimmt.

3.4. Die Verwendbarkeit verschiedener Kollagenpräparationen bei der in vitro Testung unterschiedlicher Aggregationshemmer

Das besondere Interesse zahlreicher Arbeitsgruppen gilt derzeit der pharmakologischen Beeinflussbarkeit der thrombozytären Adhäsivität und Aggregabilität. Dies verwundert nicht bei der Bedeutung, welche einer pathophysiologischen Steigerung der letztgenannten Plättcheneigenschaften für eine Reihe von Erkrankungen zukommt.

Eine Grundlage für die Untersuchung von Substanzen, welche die vorgenannten Plättcheneigenschaften hemmen, bilden Tests bzw. Testsysteme zu deren Erfassung (s.S. 18ff.). Als Aggregantien haben sich hierbei den verschiedensten Untersuchern ADP, Adrenalin und auch Kollagenpräparationen bewährt.

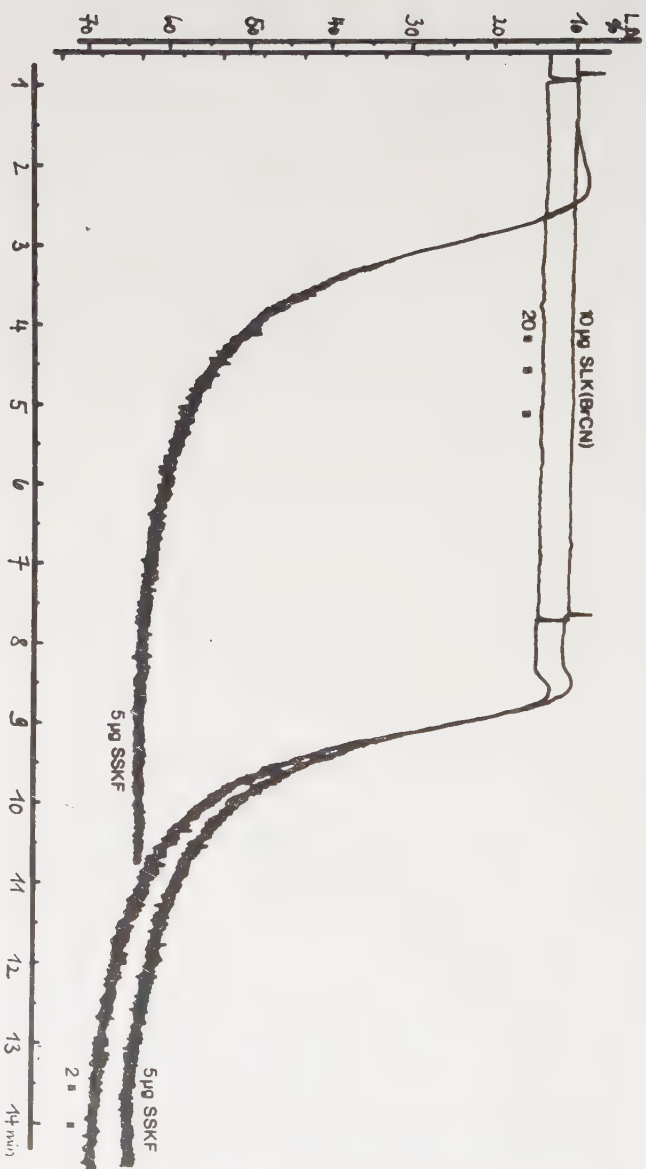


Abb. 43: Aggregation von Blutplättchen in Zitrat-PRP durch 2µg SSKF und Aggregationsversuch mit 10 und 20µg SLK(BRCN) und nachfolgender Plättchenaggregation mit 2µg SSKF.

Die Verwendbarkeit der in dieser Arbeit verwendeten Kollagenpräparationen ist auch in Hinblick auf die voranstehenden Aspekte kurz geprüft worden. Dazu untersuchen die anschließenden Experimente mit Hilfe von Kollagen die aggregationshemmende Wirkung einiger als Thrombopathifikantien bekannter Substanzen im Zitrat-PRP. Die herangezogenen Aggregationshemmer sind in der jeweils angegebenen Dosis den einzelnen Ansätzen 10 Minuten vor Aggregationsbeginn zur Inkubation zupipettiert worden, den jeweiligen Kontrollen eine gleichgrosse Menge des für den Aggregationshemmer verwendeten Lösungsmittels.

Im ersten Versuch hat SLK1 als kollagenes Plättchenaggregans in einer Dosis von 50µg pro ml PRP gedient (Abb.44a). Da der Leerwert ohne ASS (Azetylsalicylsäure) sehr gut aggregiert, ist die Hemmung der Plättchenaggregation im gleichen PRP nach Zusatz von ASS u.a. 10mg% recht eindrucksvoll. Trotzdem ist nicht zu übersehen, dass die L.D. auch unter ASS nicht ganz unverändert geblieben ist, sondern in einem annähernd linearen Anstieg um etwa 7% zugenommen hat.

Die Aggregation der Blutplättchen durch Adrenalin im gleichen System erfährt durch ASS u.a. 10mg% ebenfalls eine Hemmung (Abb.44b). Diese Hemmung betrifft die "second wave" des charakteristischen Kurvenverlaufs, den die Messung der Plättchenaggregation unter Adrenalin (1µg) im Born-Apparat bietet. Der Verlauf der "first wave" ist kaum verändert. Einen entsprechenden Befund erhebt man auch, wenn man die Adrenalinosis verfünf- oder verzehnfacht.

Die Hemmung der ADP induzierten Aggregation von Blutplättchen durch ASS betrifft ebenfalls nur die "second wave". Die "first

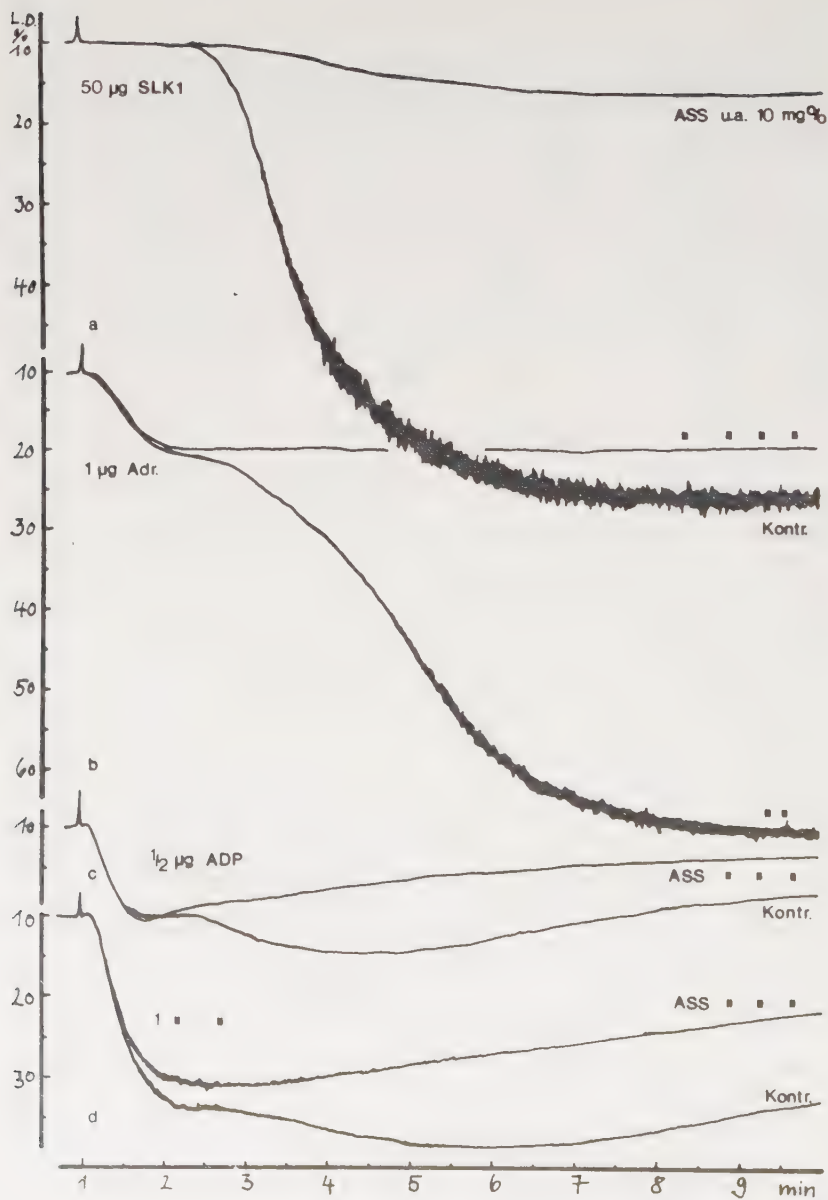


Abb.44a-d: Hemmung der Plättchenaggregation unter Kollagen (SLK1) (a), Adrenalin (b) und ADP (c und d) mittels ASS u.a. 10mg% in vier verschiedenen Zitrat-PRP (a-d).

wave" erreicht die des zugehörigen Leerwertes mehr (c) oder weniger (d). Die Beurteilung einer ASS-Wirkung auf Blutplättchen ist durch deren Aggregation mittels ADP wohl weniger deutlich und differenziert zu treffen als durch Aggregation mittels Adrenalin und geeignetem Kollagen.

In der nächsten Untersuchung ist der ASS Phenylbutazon als Aggregationshemmer gegenübergestellt (Abb.45). Dazu sind von

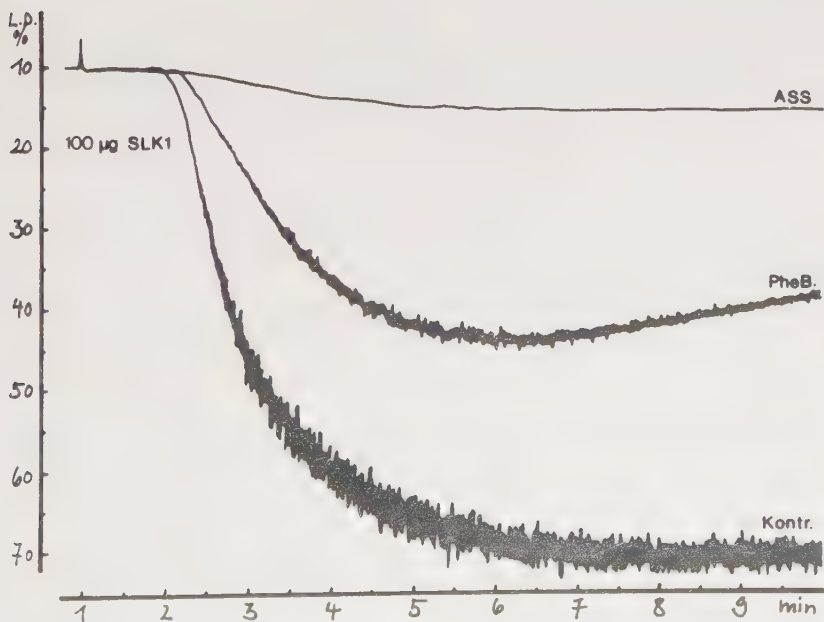


Abb.45: Hemmung der Kollagen (SLK1) induzierten Aggregation von Blutplättchen durch ASS und Phenylbutazon je u.a. 5mg%.

beiden Substanzen Dosen u.a. 5mg% getestet worden. Die Kollagenodosis hat dieses Mal aus 100µg SLK1 bestanden. Obwohl auch Phenylbutazon eine recht deutliche Hemmwirkung auf die Plättchenaggregation hat, erreicht es in dieser Hinsicht nicht die Wirkung einer gleichen Gewichtsmenge von ASS. Äquivalente Dosen beider Pharmaka liessen sich in vitro leider nicht vergleichen. Im übrigen hemmt, verglichen mit dem vorangegangenen Versuch (Abb.44a), die halbe ASS-Dosis die Plättchenaggregation noch ebenso gut, obwohl im Beispiel der Abb.45 die Menge des Aggregats verdoppelt worden ist. Trotz guter Aggregationshemmung ist auch hier wieder ein geringer, annähernd linearer Anstieg der L.D. unverkennbar.

Für die folgenden Aggregationsansätze dieser Reihe ist SSKF als kollagenes Aggregans für Blutplättchen in Zitrat-PRP herangezogen worden. Und zwar in einer Dosis von 2µg um im nächsten Experiment die hemmende Wirkung von Novaminsulfon in Form von »Novalgin« u.a. 0,5mg% der Wirkung von ASS u.a. 5mg% gegenüberzustellen (Abb.46). Dabei erweist sich auch Novaminsulfon als starkes Thrombozytopathifikans, dessen Wirksamkeit eine Messung der Plättchenaggregation mit SSKF im Zitrat-PRP gut erfasst.

Das PRP dieses letzten Beispiels zeichnet sich im übrigen durch ein auffallend ausgeprägtes »swelling« seiner Plättchen aus. Unter der die Aggregation vollhemmenden ASS-Dosis erscheint letzteres etwas gedämpft, vor allem jedoch sehr gedehnt. Unter der ein wenig schwächer wirksamen Novaminsulfondosis erreicht das »swelling« die Höhe des entsprechenden Kontrollwertes, seine Phase ist ebenfalls deutlich gedehnt.

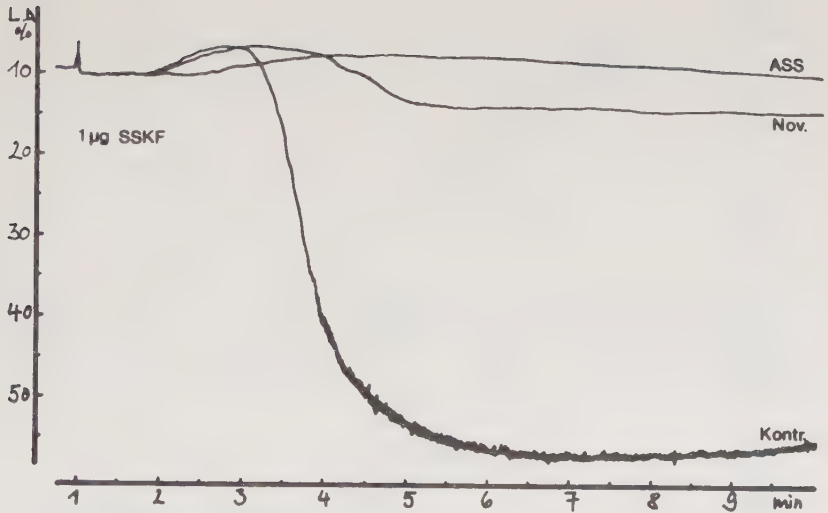


Abb.46: Hemmung Kollagen (SSKF) induzierter Aggregation von Blutplättchen durch ASS u.a. 5mg% und Novaminsulfon („Novalgin“) u.a. 0,5mg%.

Als letztes Beispiel für den *in vitro* Nachweis der Wirksamkeit einer die Plättchenaggregation hemmenden Substanz mit 1µg SSKF ist Indometacin ebenfalls ASS gegenübergestellt worden (Abb.47). Während Indometacin 0,05mg%ig noch eine nachweisbare Wirkung auf die Plättchenaggregation ausübt, hemmt es diese 0,2mg%ig angewendet bereits voll. Die gleiche ASS-Dosis ist dagegen schwächer wirksam und hemmt wie die kleinere Indometacindosis die Aggregation der Plättchen nur teilweise. Bei dem Kontrollwert der Abb.47 beobachtet man wiederum ein deutliches „swelling“ der Plättchen. Während dies unter aggregationshemmenden Dosen, die erst teilweise wirken, noch vorhanden ist, ist es bei vollgehemmter Aggregation ausgeblieben. Trotzdem wird aber auch hier noch ein geringer, annähernd li-

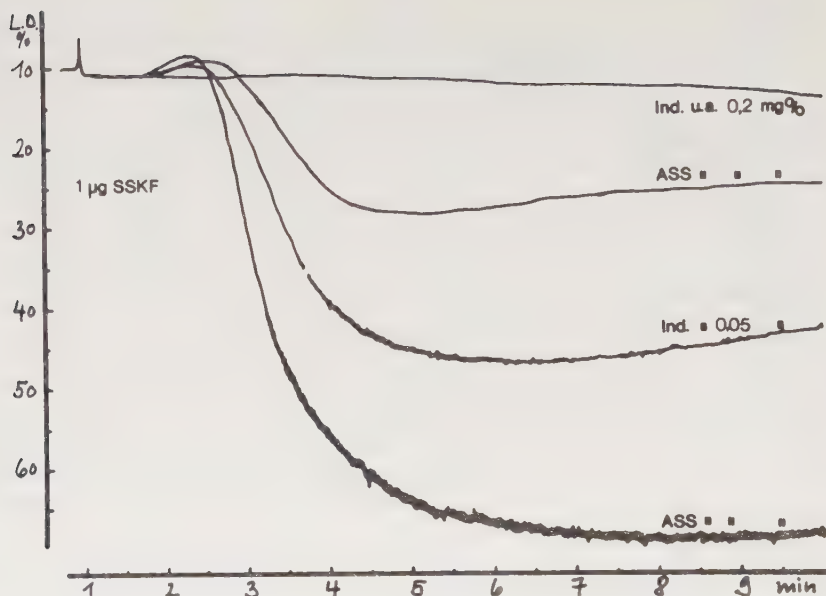


Abb.47: Hemmung Kollagen (SSKF) induzierter Aggregation von Blutplättchen in Zitrat-PRP durch ASS u.a. 0,2mg% und Indometacin ("Amunon") u.a. 0,2 und 0,02mg%.

nearer Anstieg der L.D. registriert (s.a.S.81).

Eine hemmende Wirkung von ASS u.a. 10mg% auf sequestren-gewaschene, in 0,9%iger NaCl-Lösung resuspendierte Blutplättchen hat sich ebenfalls mit SSKF untersuchen lassen (Abb.48). Infolge des Fehlens von Ca^{++} Ionen aggregieren diese Plättchen zunächst überhaupt nicht. Selbst nach Zugabe von 25µg SSKF gibt die Messung im Born-Apparat überhaupt keine Veränderung der L.D. an. Setzt man der plättchenreichen NaCl-Lösung bzw. Suspension aber CaCl_2 z.B. u.a. 30mg%ig zu, so erzielen 5µg SSKF eine messbare Aggregation der gewaschenen Plättchen (s.a.

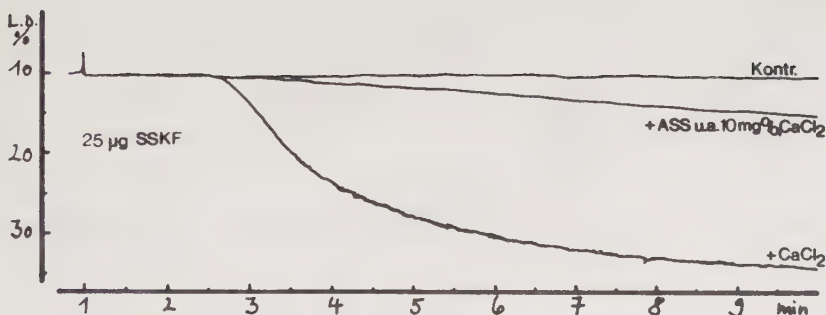


Abb.48: Wirkung von ASS u.a. 10mg% auf die Kollagen (SSKF) induzierte Aggregation sequestren-gewaschener und in 0,9%iger NaCl-Lösung resuspendierter Blutplättchen (mit und ohne CaCl₂ u.a. 30mg%).

S.44).

Inkubiert man dieses zuletzt beschriebene System vor der Aggregation noch 10 Minuten mit ASS u.a. 10mg%, so wird die Aggregation der gewaschenen Plättchen wie im PRP gehemmt. Freilich verändert sich auch hier die L.D. geringfügig mit einem annähernd linearen Anstieg.

Um diese geringgradigen und annähernd linearen Anstiege der L.D. zu klären, die bei den Versuchen thrombopathifizierte Blutplättchen mit Kollagen zu aggregieren immer wiedergekehrt sind, sind der Küvette synchron zur Messung im Born-Apparat Proben von 10 bzw. von 20µl zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen und unter dem Phasenkontrastmikroskop untersucht worden.

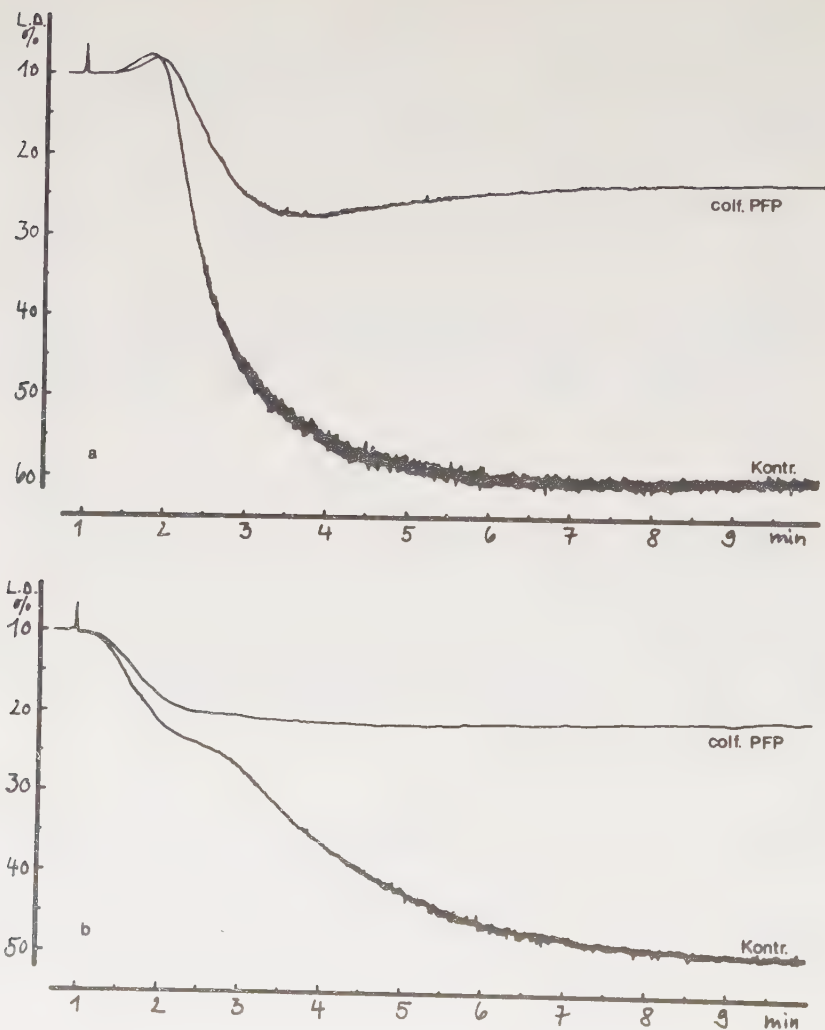


Abb. 49a,b: Hemmender Einfluss von PFP "Colfarit"-behandelter Personen auf die Plättchenaggregation gesunder Kontrollpersonen mittels 2,5 µg SSKF (a) und 1 µg Adrenalin im Zitrat-PRP.

Dabei hat sich gezeigt, dass die gut sichtbaren Kollagenfib-

rillen die Blutplättchen zwar nicht mehr zur Aggregation bringen, aber dass zahlreiche thrombopathifizierte, d.h. aggregationsgehemmte Plättchen an den Fibrillen adhärieren und diese schliesslich völlig und dickklumpig umhüllen.

In zwei letzten Untersuchungen zur in vitro Erfassung von thrombopathifizierenden Einflüssen mit Hilfe der SSKF im Born-Apparat, ist das PRP zweier gesunder Kontrollpersonen jeweils mit 0,4 bis 0,5ml PFP von »Colfarit« behandelten Personen (1,5g ASS per die) auf die übliche Plättchenzahl von 200.000/mm³ eingestellt worden (Abb.49a,b). Für die Kontrolle ist letzteres mit dem PFP weiterer gesunder Kontrollpersonen geschehen. Eine hemmende Wirksamkeit »colfaritisierten« PFP auf die Blutplättchen gesunder Kontrollpersonen ist sowohl bei Verwendung von 1µg Adrenalin als auch unter 2½µg SSKF als Aggregans nachzuweisen.

3.5. Die Verwendung sauersuspendierter Kollagenfibrillen (SSKF) zur Testung der Plättchenadhäsion und -aggregation im Kollagen-Zentrifugiertest und im Born-Aggregometer

Nachdem sich, wie es die Ergebnisse der vorausgegangenen Untersuchungen zeigen, die Verwendung der SSKF für Aussagen über die Adhäsion und die Aggregation von Thrombozyten an bzw. mittels Kollagen als recht brauchbar erwiesen hatte, erschien es sinnvoll, sich in einigen anschliessenden Untersuchungen zu orientieren, wie weit man unter Verwendung von SSKF in der Aggregometrie nach Born (s.S.19) und dem neuentwickelten Kollagen-Zentrifugiertest (s.S.23) für die Klinik relevante Befunde zur Funktion der Blutplättchen erheben kann.

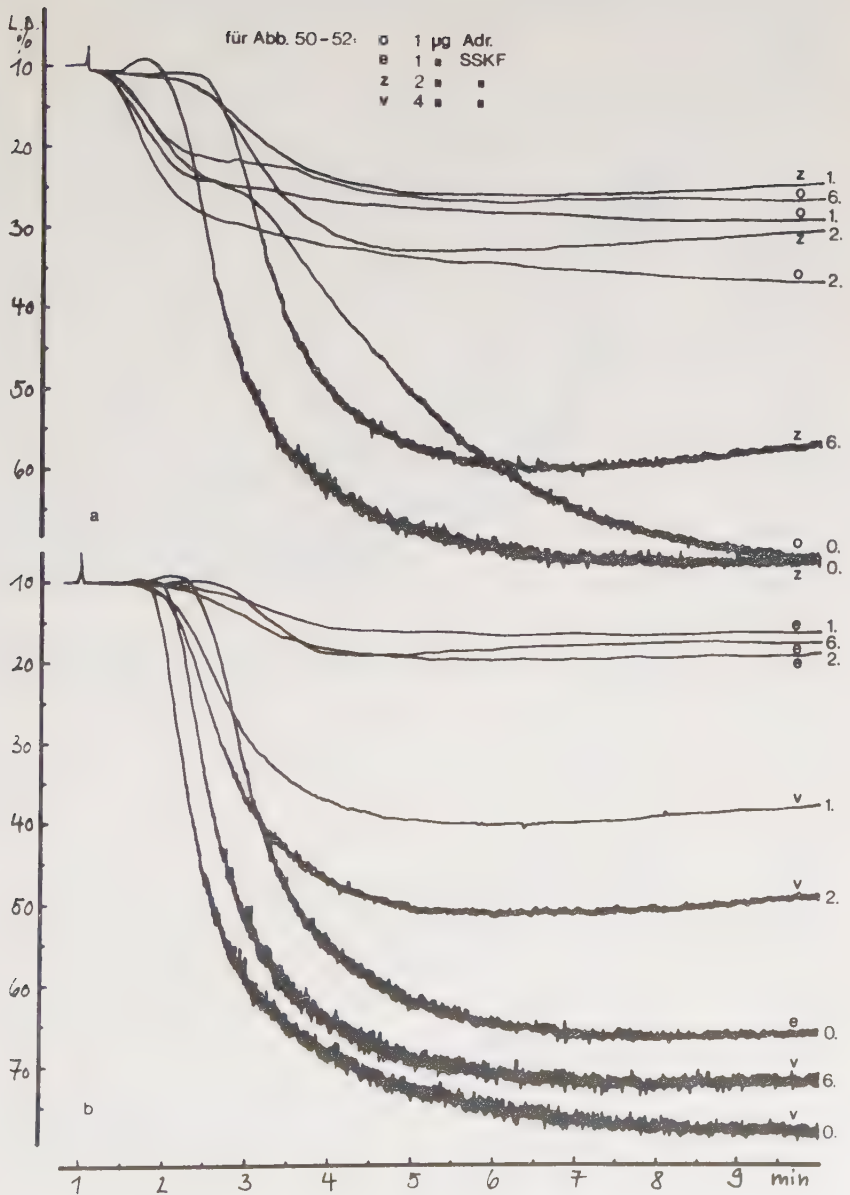
In diesem Zusammenhang hat es zu allererst und besonders interessiert qualitative und möglichst auch quantitative Aussagen zu derzeit nur unbefriedigend bzw. überhaupt nicht fassbaren, in vivo thrombopathifizierend wirkenden Einflüssen zu erhalten.

3.5.1. Vergleichende Untersuchung der Plättchenaggregabilität im zitratisierten Vollblut und im PRP vor und nach einer Azetylsalizylsäure Behandlung

In einer ersten Versuchsreihe ist die Aggregabilität der Blutplättchen dreier gesunder Kontrollpersonen nach einmaliger Einnahme von 1,5g Azetylsalizylsäure (ASS) in Form von »Colfarit« mit Hilfe des Born-Apparates und des Kollagen-Zentrifugiertests unter Verwendung von SSKF als Aggregans im Verlauf mehrerer Tage untersucht worden.

Dazu wurde im Born-Apparat die Plättchenaggregation jeweils mit 1, 2 und 4µg SSKF sowie mit 1µg Adrenalin einmal vor der ASS-Einnahme sowie am 1., 2. und 6. Tag danach (Abb.50-52, a-b) gemessen. In allen drei untersuchten Fällen zeigen die Messungen der Plättchenaggregation im PRP nach Born sowohl unter Adrenalin als auch unter Kollagen (SSKF) deutlich eine Hemmung dieser Thrombozytenleistung nach einmaliger oraler Gabe von 1,5g ASS. Dessen Wirkung auf die Thrombozyten ist in Abhängigkeit vom Individuum und in Abhängigkeit von der verwendeten Kollagendosis pro ml PRP bis zum 6.Tag nach der Einnahme noch

Abb.50a,b: Aggregationsverhalten der Plättchen einer gesunden Kontrollperson (Zw.♂) vor und 1, 2 bzw. 6 Tage nach einmaliger Einnahme von 1,5g Azetylsalizylsäure in Form von »Colfarit«.



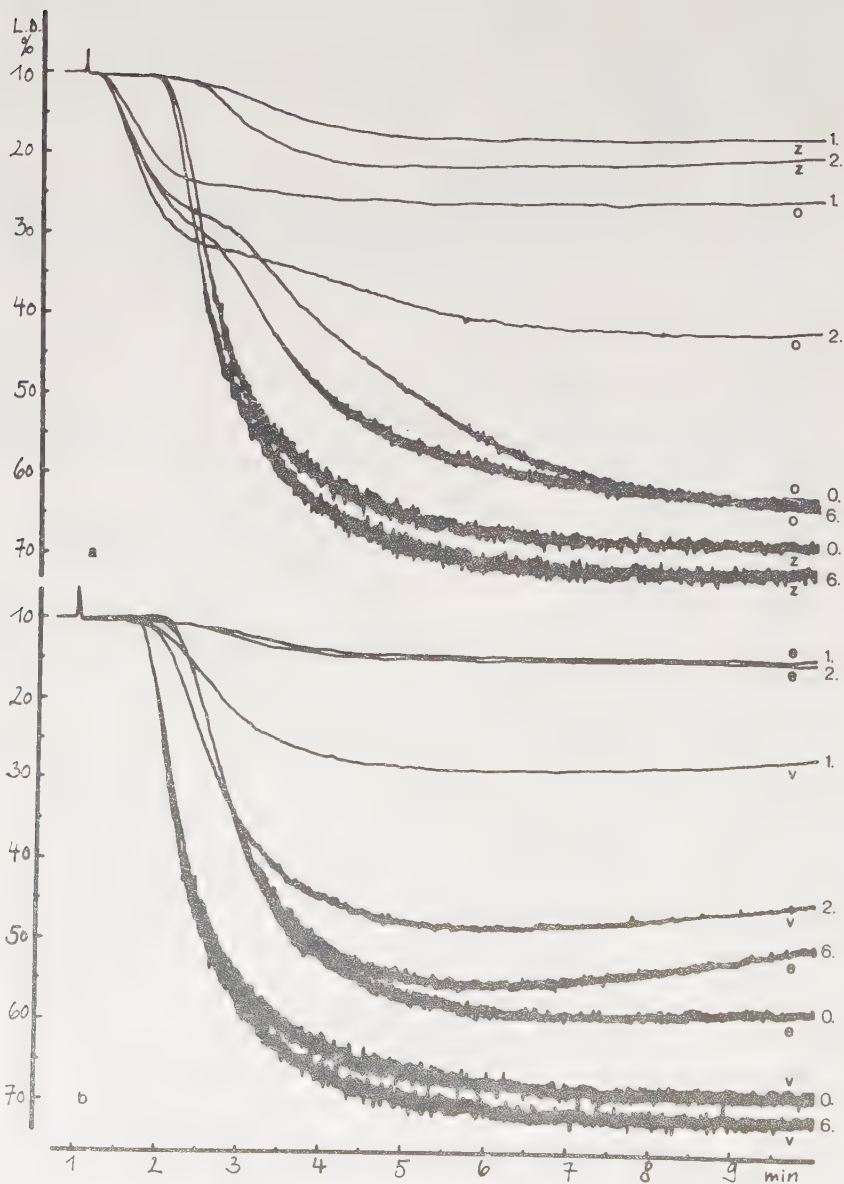


Abb.51a,b: Aggregationsverhalten der Plättchen einer gesunden Kontrollperson (Su.8) vor und 1, 2 bzw. 6 Tage nach einmaliger Einnahme von 1,5g Azetylsalizylsäure in Form von "Colfarit".

mehr oder weniger deutlich ausgeprägt.

Während die Plättchen des PRP von Abb.50 und 52 in verschiedenen Messungen ein "swelling" zeigen, fehlt dies den Plättchen der Abb.51 gänzlich. Dagegen dokumentieren alle Beispiele nochmals die Abhängigkeit der Reaktionszeit (s.S.21 und S.60) von der verwendeten Kollagendosis..

Das Verhalten der beiden PRP deren Plättchen ein "swelling" zeigen sei noch etwas näher beschrieben. Im Fall der Abb.50 ist dieses "swelling" unter 4 μ g SSKF vor der ASS-Gabe nur angedeutet, wogegen es bis zum 6.Tag nach dessen Einnahme nicht einmal mehr angedeutet erscheint. Unter 1 und 2 μ g SSKF ist das "swelling" vor der ASS-Einnahme deutlich ausgebildet, um dann ebenfalls bis zum 6.Tag darnach unterdrückt zu bleiben (der 1 μ g-Wert am 6.Tag allenfalls ausgenommen). Dieses Verhalten im "swelling" findet sich im Grunde auch bei den Thrombozyten des PRP der Abb.52, wobei hier allerdings der 2 μ g-Wert am 2.Tag nach der ASS-Einnahme etwas aus der Reihe fällt.

Im übrigen stimmen die Ergebnisse dieser Untersuchung auch gut mit den Befunden zur Plättchenaggregation überein, die bereits zuvor bei der in vitro Einwirkung von ASS auf PRP erhoben werden konnten (s.S. 81ff.).

Gerade diese Versuchsreihe schien besonders geeignet der Messung der Plättchenaggregation nach Born den im Rahmen der vorliegenden Arbeit neuentwickelten Kollagen-Zentrifugiertest gegenüberzustellen (Abb.53-55). Dazu ist der letztere Test jeweils gleichzeitig mit dem Born-Test (Abb.50-52, a-b) unter

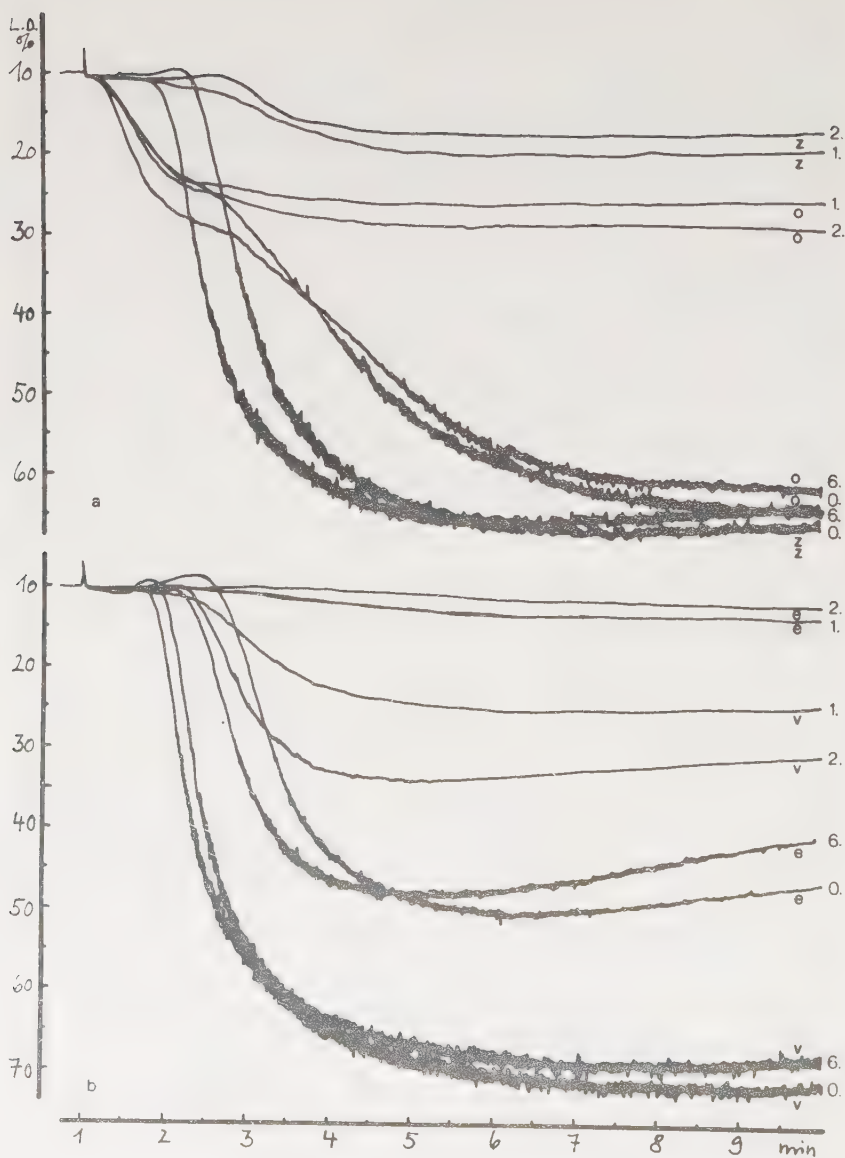


Abb.52a,b: Aggregationsverhalten der Plättchen einer gesunden Kontrollperson (Mu.♀) vor und 1, 2 bzw. 6 Tage nach einmaliger Einnahme von 1,5g Azetylsalizylsäure in Form von "Colfarit".

Verwendung von 1, 2, 3 und 5µg Kollagen in Form der SSKF durchgeführt worden.

Beim Probanden der Abb.53 hat der 2µg-Wert am 6.Tag und der

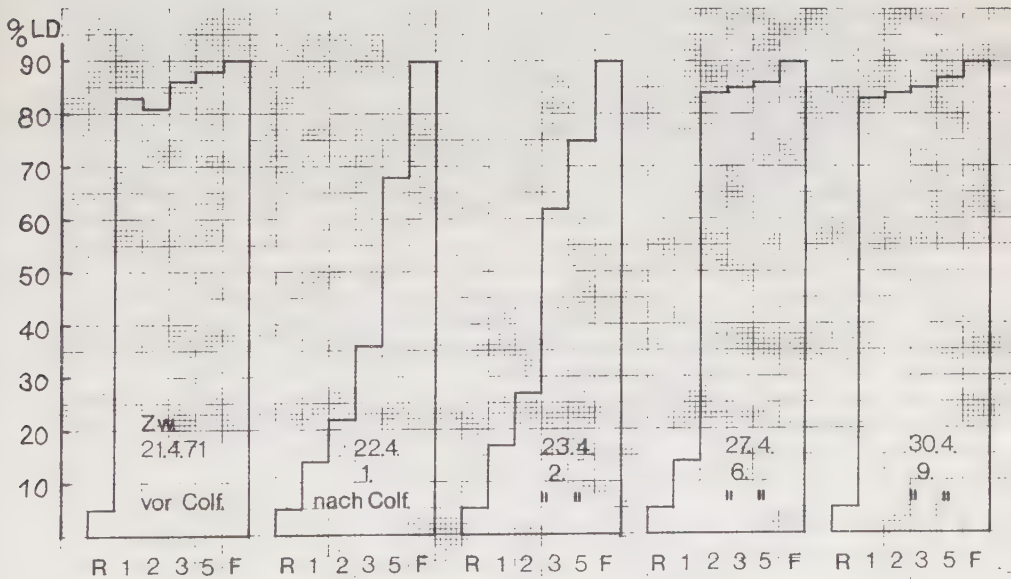


Abb.53: Kollagen-Zentrifugiertest einer gesunden Kontrollperson (Zw.♂) vor sowie 1, 2, 6 und 9 Tage nach einmaliger Einnahme von 1,5g Azetylsalizylsäure in Form von "Colfarit".

1µg-Wert am 9.Tag nach einer einmaligen Einnahme von 1,5g ASS in Form von "Colfarit", gemessen an der L.D., den Normbereich (s.S. 35) wieder erreicht. Dagegen erreichen die 2µg-Werte beim

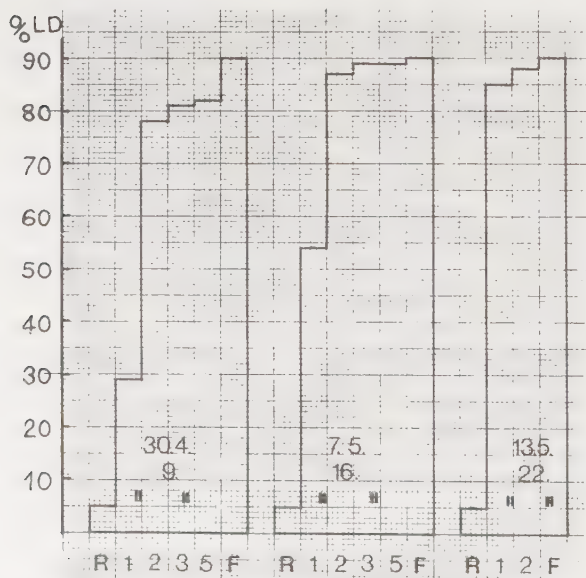
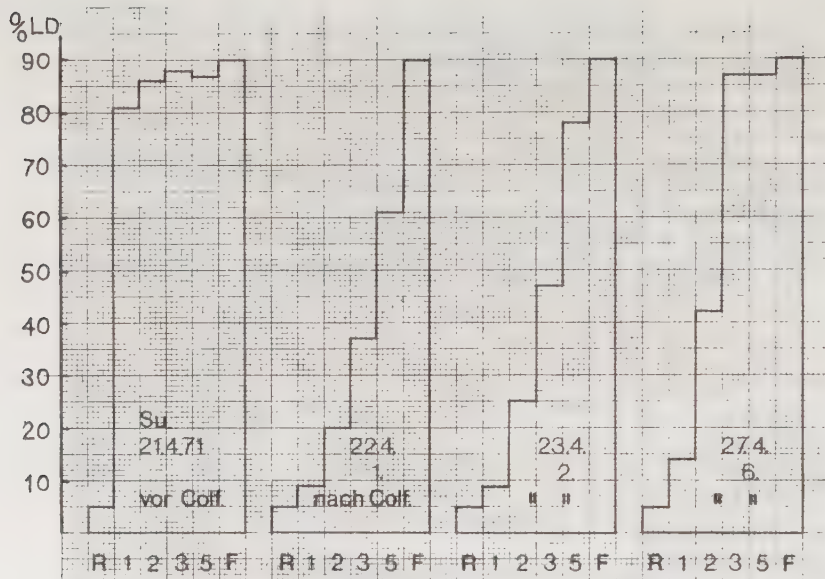
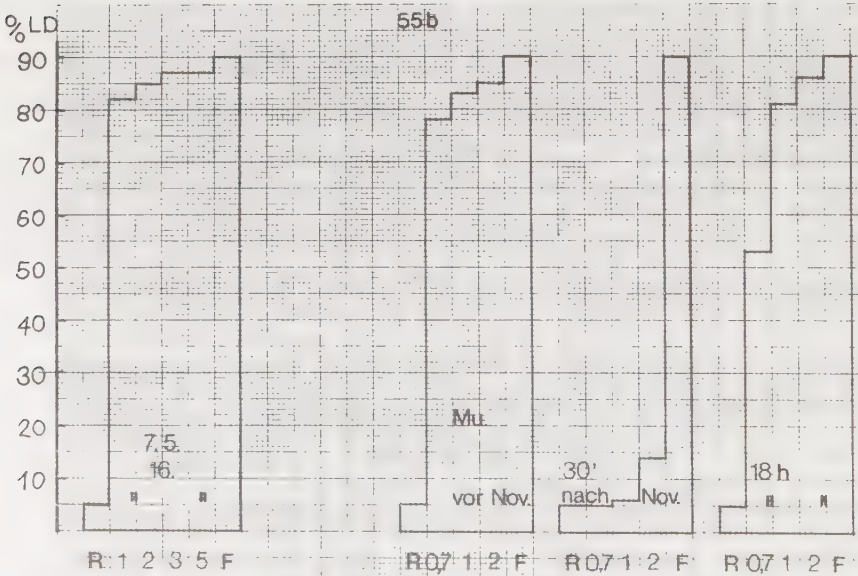
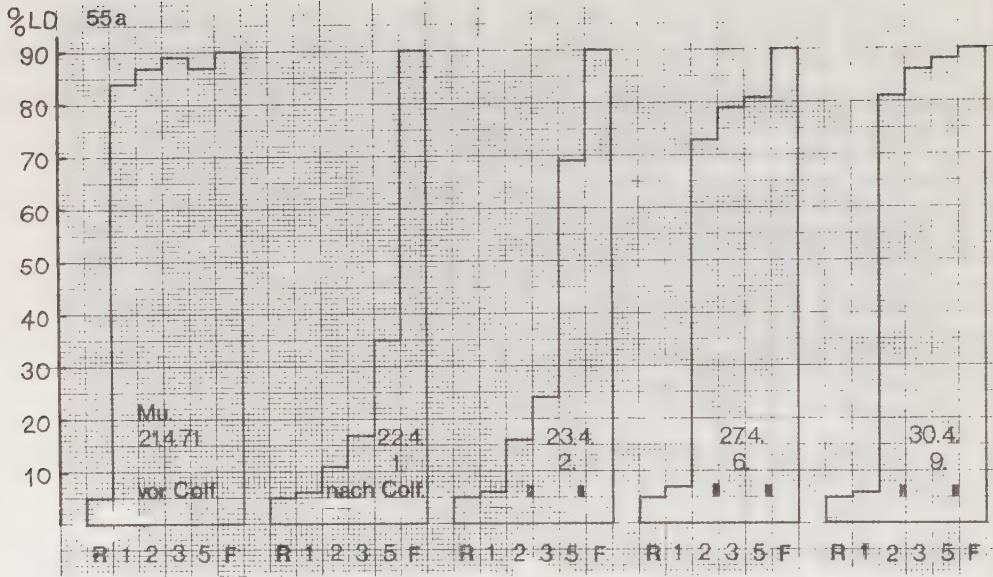


Abb.54: Kollagen-Zentrifugiertest einer gesunden Kontrollperson (Su.♂) vor sowie 1, 2, 6, 9, 16 und 22 Tage nach einmaliger Einnahme von 1,5g ASS in Form von „Colfarit“.

zweiten (Abb.54) und beim dritten Probanden (Abb.55) ihre Norm knapp bzw. gerade wieder am 9.Tag, während die 1 μ g-Werte bis zum 16. bzw. bis zum 9.Tag den Normbereich noch nicht wieder erreicht haben. Diese individuell unterschiedliche Zeitdauer der Wirksamkeit von ASS auf die Aggregabilität der Blutplättchen von drei Normalpersonen verdeutlicht der Born-Test am PRP weniger gut als der Kollagen-Zentrifugiertest am zitratisierten Vollblut. In beiden Tests ist der Eindruck der durch ASS gehemmten Plättchenaggregation bei der Verwendung von Kollagen als Aggregans recht abhängig von dessen Dosierung.

Die in vivo Wirkung einer einmaligen intravenösen Gabe von 2,0g Novaminsulfon in Form von „Novalgin“ auf die Thrombozytenaggregabilität im Kollagen-Zentrifugiertest des dritten Probanden zeigt die Abb.55b. In diesem Fall sind 0,7, 1 und 2 μ g Kollagen pro ml Zitratblut zur Plättchenaggregation verwendet worden. Bereits 18 Stunden nach der „Novalgin“-Injektion hat die anfänglich eindrucksvoll gehemmte Aggregation der Thrombozyten zumindest unter 1 und 2 μ g Kollagen ihren Normbereich in diesem Test wieder erreicht. Letzteres hat wie oben beschrieben nach einmaliger oraler Gabe von 1,5g ASS länger als 9 Tage gedauert.

Abb.55a,b: Kollagen-Zentrifugiertest einer gesunden Kontrollperson (Mu.♀) vor sowie 1, 2, 6, 9 und 16 Tage nach einmaliger Einnahme von 1,5g ASS in Form von „Colfarit“ (b), bzw. vor sowie 1 und 18 Stunden nach einmaliger Injektion von 2,0g Novaminsulfon in Form von „Novalgin“.



3.5.2. Messung der Plättchenaggregation mit SSKF bei einigen Patienten während einer ASS („Colfarit“) Behandlung

Nachdem die Ergebnisse der zuletzt beschriebenen Untersuchungsreihe vorlagen, lag es nahe sich über die klinische Brauchbarkeit des Nachweises der *in vivo* Wirkung von ASS mit SSKF als kollagenem Plättchenaggregans zu orientieren.

Die Patientin, deren Plättchenaggregation Abb.56a,b wiedergibt wurde nach dem 15.12.70 bis zu ihrer Entlassung aus der Klinik täglich mit 1,5 ASS in Form von „Colfarit“ behandelt. Die Aggregationskurven sind im Born-Apparat unter Verwendung von jeweils 5 μ g SSKF pro ml PRP entstanden. Der Ausgangswert vor Therapiebeginn entspricht der Kurve vom 15.12.70. Diese unterscheidet sich nicht nur im Aggregationsmaximum (s.S.21), sondern auch in der Reaktionszeit, im „swelling“ und in der Kurvenamplitude von den unter der ASS-Therapie erhaltenen Messkurven. Die letzteren zeichnen sich allerdings nicht durch eine besonders gute quantitative Übereinstimmung untereinander aus.

Am 13.1.71 ist das PRP der gleichen Patientin nicht nur mit 5 μ g sondern auch mit 25 und 50 μ g SSKF aggregiert worden (Abb. 56b). In der 5 μ g-Kurve deutet sich ein „swelling“ an, welches sich nahezu 8 Minuten hinzuziehen scheint. Bei Verwendung genügend hoher Kollagendosen (im vorliegenden Fall 25 und 50 μ g) erreicht die Plättchenaggregation auch im PRP eines „Colfarit“ Behandelten wieder ein ansehnliches Ausmass. Trotzdem fallen die beiden entsprechenden Kurven durch ihren flachen Aggregationswinkel sowie durch ihre beachtenswert schmale Amplitude auf.

Die Messungen der Abb.56c stellen das Aggregationsverhalten

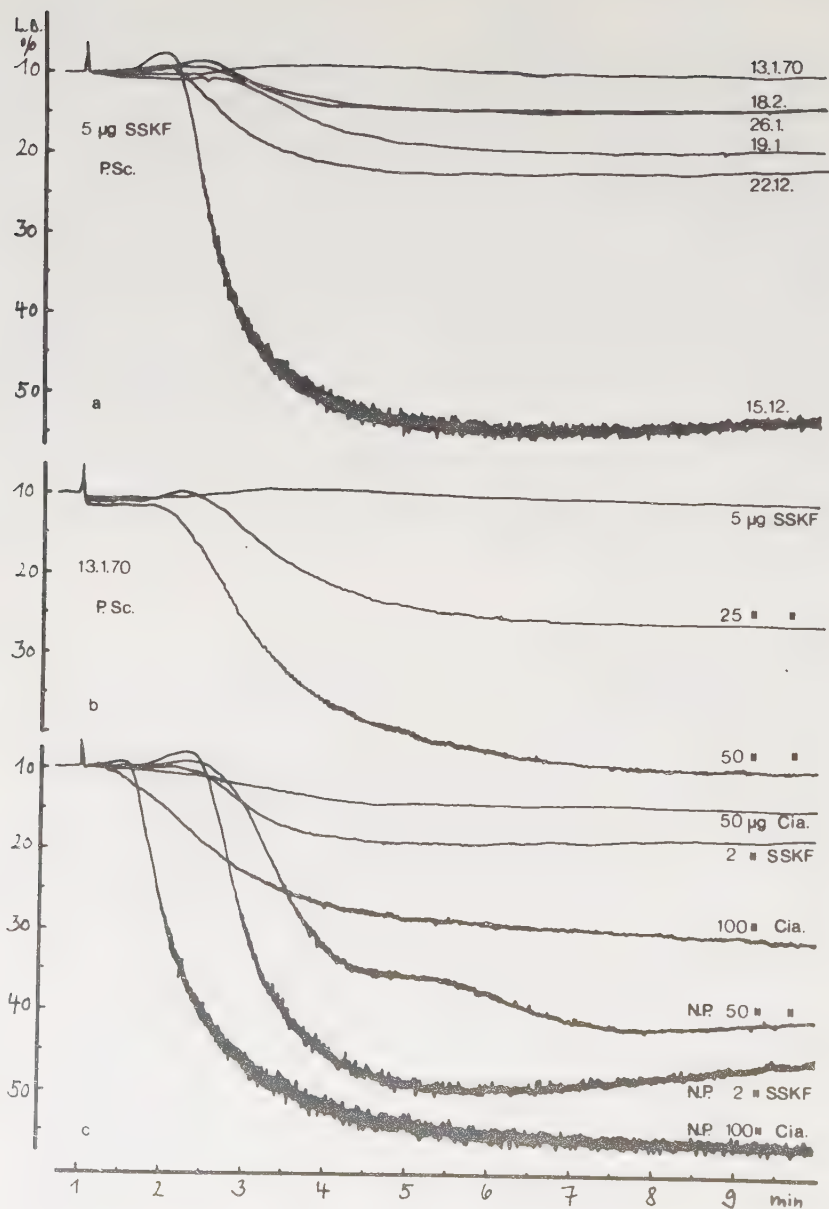
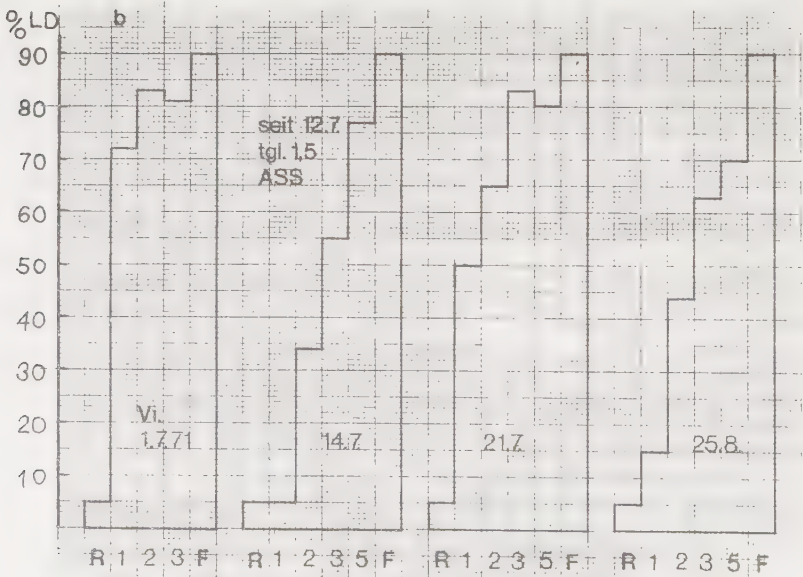
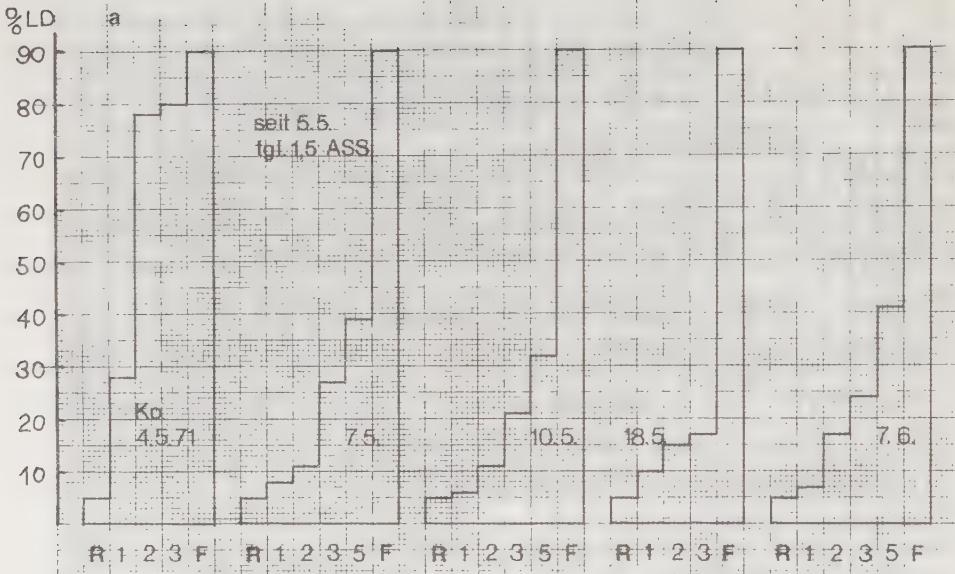


Abb.56a-c: Aggregationsverhalten der Blutplättchen einer Patientin vor und während einer "Colfarit" Behandlung unter Verwendung verschiedener Kollagendosen im Born-Aggregometer (a und b), sowie einer weiteren Patientin (c) unter Verwendung von SSKF und "Cialit" als Aggregans im Vergleich mit einer gesunden und unbehandelten Kontrollperson (NP).

der Thrombozyten im PRP einer weiteren mit "Colfarit" behandelten Person dem einer unbehandelten Kontrollperson (NP) gegenüber. Neben Kollagen (SSKF) ist hier 2-(aethyl-mercuri-mercapto)-benzoxazol-5-carbonsaures Natrium ("Cialit") als Plättchenaggregans verwendet worden. Die Wirkung beider Aggregantien auf die Blutplättchen wird durch die ASS-Behandlung abgeschwächt. Auch bei der Verwendung von "Cialit" lässt sich diese Abschwächung der aggregierenden Wirkung durch eine Dosiserhöhung des Aggregans teilweise kompensieren. Was die "Cialit" Kurven betrifft (s.a.S.58), so sei nochmals auf das Auftreten einer Reaktionszeit auch bei Verwendung dieses Aggregans hingewiesen.

Abb.57 gibt die Ergebnisse der ersten orientierenden Untersuchungen wieder, ebenfalls mit Hilfe des Kollagen-Zentrifugiertests die in vivo Wirkung einer ASS-Therapie auf die Aggregabilität der Thrombozyten zu erfassen. Bei jedem zu dieser Untersuchung herangezogenem Patienten (a-c) sind vor Therapiebeginn unter Verwendung von 1 und 2µg bzw. von 1, 2 und 3µg Kollagen die Ausgangswerte (Leerwerte) bestimmt worden. Während im Fall der Abb.57a der 1µg-Leerwert mit einer L.D. von 28% nicht im Normbereich (s.S.35) und der 2µg-Leerwert mit 78% an dessen unterster Grenze gelegen ist, entsprechen die Ausgangswerte in den Fällen der Abb.57b,c der Norm.

Nach Bestimmung der Ausgangswerte wurde den Patienten täglich dreimal 0,5g ASS in Form von "Colfarit" verordnet. Unter die-



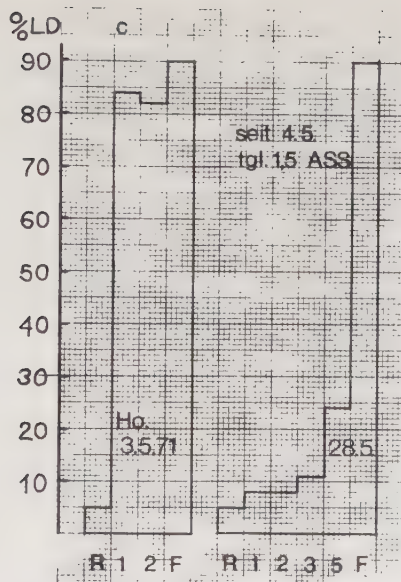


Abb.57a-c: Kollagen-Zentrifugiertest bei drei verschiedenen Patienten vor und während einer Behandlung mit ASS in Form von „Colfarit“.

ser Therapie (1,5g ASS per die) ist die Plättchenaggregabilität besonders im Zitratblut der Patienten der Abb.57a und c unter 1 und 2 μ g Kollagen stark, und unter 3 und 5 μ g noch recht deutlich eingeschränkt. Bei der zweiten Patientin (Abb.57b) zeigt der Kollagen-Zentrifugiertest keine derartig deutliche und überzeugende aggregationshemmende Wirkung der ASS auf die Thrombozyten auf. Während sich im Fall der Abb.57a die Schwankungen der L.D. unter gleichen Kollagendosen an den verschiedenen Untersuchungstagen etwa innerhalb der Streubreite des Tests (s.S.31) bewegt haben, streuten diese Lichtdurchlässigkeiten und damit wohl auch die Hemmung der Plättchenaggregabi-

lität im Kollagen-Zentrifugiertest des Falls der Abb.57b erheblich.

Schliesslich sei auch nochmals darauf hingewiesen, dass sich im Kollagen-Zentrifugiertest die aggregationshemmende in vivo Wirkung der ASS auf die Blutplättchen bis zu einem gewissen Grad ebenfalls durch einfache Erhöhung der aggregierenden Dosis kompensieren lässt (s.a.S.99 u.a.).

3.5.3. Die Plättchenaggregabilität bei einigen Patienten mit einer thrombopathifikantienpositiven Anamnese

Nachdem sich die in vivo Wirkung b e k a n n t e r ASS-Dosen auf die Plättchenaggregabilität im Zitratblut und im PRP derart nachweisen liess, hat es interessiert in gleicher Weise die Wirkung von als Thrombopathifikantien bekannten Giften, d. h. Pharmaka, in anderem klinischen Zusammenhang als dem der Therapie nachzuweisen.

Abb.58a zeigt Aggregationskurven, die unter Verwendung von 1 μ g ADP und 5 μ g Kollagen (SSKF) im Born-Apparat entstanden sind. Einem Kontroll-PRP (N.P.) ist hier das PRP einer Patientin mit angeblichem ASS-Abusus gegenübergestellt worden. Die beiden unter ADP erhaltenen Kurven unterscheiden sich lediglich im deutlich schlechteren Desaggregationsverhalten des Kontroll-PRP. Die Unterschiede im Aggregationsverhalten mehrten sich demgegenüber beträchtlich bei der Verwendung von Kollagen als Aggregans. Jene finden sich nicht nur in der Reaktionszeit, sondern auch im "swelling", im Aggregationswinkel, im Aggregationsmaximum sowie in der Aggregationsamplitude. Ein derartiger mit SSKF als kollagenem Aggregans erhobener Befund klassifiziert die Blutplättchen der Patientin (Abb.58a) eindeutig als

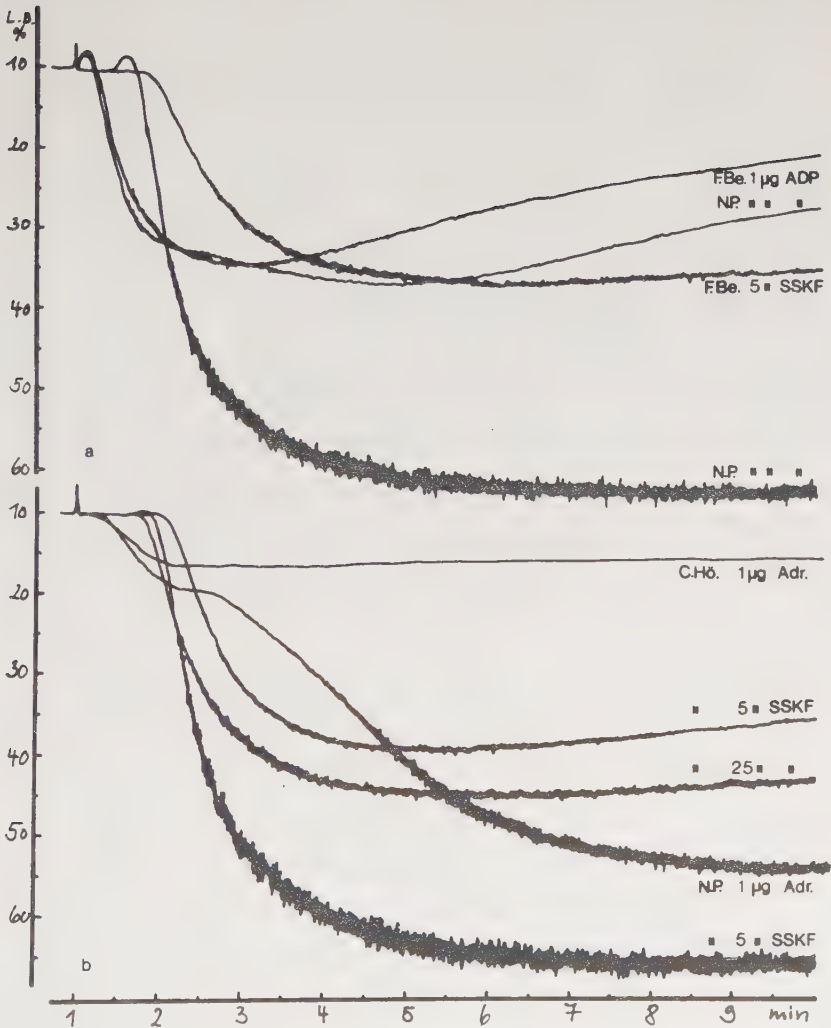


Abb. 58a,b: Aggregationsverhalten der Thrombozyten einer gesunden Kontrollperson (N.P.) und einer Patientin mit ASS-Abusus unter Verwendung von ADP und Kollagen als Aggregantien (a), sowie einer weiteren N.P. und eines Patienten mit Phenylbutazon-Abusus unter Verwendung von Adrenalin und Kollagen als Aggregantien (b).

thrombopathifiziert.

Abb.58b zeigt entsprechende Messergebnisse zur Plättchenaggregation bei einem Fall von Phenylbutazonabusus. Dieses Mal ist neben SSKF Adrenalin als Aggregans verwendet worden. Das zum Vergleich herangezogene Kontroll-PRP aggregiert sowohl unter $1\mu\text{g}$ Adrenalin als auch unter $5\mu\text{g}$ Kollagen beispielhaft. Dagegen zeigen die thrombopathifizierten Plättchen unter einer gleichgrossen Adrenalindosis nur noch eine "first wave", die einen abgeflachten Aggregationswinkel aufweist. Was das Aggregationsverhalten derselben Plättchen unter Kollagen anbelangt, so kann man hier das zuvor zur Abb.58a Gesagte wiederholen. Eine Erhöhung der Kollagendosis von $5\mu\text{g}$ pro ml PRP auf das Doppelte ($10\mu\text{g}$) verstärkt eindeutig, doch nicht besonders eindrucksvoll die Aggregation der durch Phenylbutazon alterierten Plättchen. Darüberhinaus sind die Messungen der Abb.58 wiederum ein Beispiel für das inkonstante Auftreten des "swelling".

Bei einigen Patienten mit einer ASS-positiven Anamnese (Tab.6) ist die Plättchenaggregation im Zitratblut unter Zuhilfenahme des Kollagen-Zentrifugiertests untersucht worden (Abb.59). Alle Beispiele zeigen in diesem Test eine mehr oder weniger ausgeprägte Hemmung der Plättchenaggregation. Beim Patienten Wa.♂ konnte die Aggregabilität der Thrombozyten nach Einnahme von 6 Tabletten "Togal" (entsprechend $1,5\text{g}$ ASS) über 9 Tage verfolgt werden. Während der $2\mu\text{g}$ -Wert in diesem Fall am 7.Tag seine Norm (s.S.35) wieder erreicht hat, liegt der $1\mu\text{g}$ -Wert am selben Tag noch recht weit und am 9.Tag nach der "Togal" Einnahme immer noch deutlich erkennbar unter der Norm (s.a.S.95).

Die Untersuchung der Plättchenaggregation bei drei Patienten

Patient	Anamnese	g ASS/Tabl.
La.♀	vor 3 Tagen 8 Tbln. »Treupel«	0,125
Re.♀	am Vortag »Thomapyrin« Tbln.	0,25
Di.♀	nimmt »hin und wieder« Schmerzmittel ein	
Mo.♀	vor 2 Tagen 1 Tbl. »Gelonida«	0,25
Hä.♀	seit 4 Wochen wöchentlich etwa 6 Tbln. »Neuralgin«	0,25
Mo.♂	vor 2 Tagen 1 »Schmerztabletten«	
Wa.♂	Hämophilie A, vor 12 Stunden 6 Tbln. »Togal«	0,25

Tab.6: Patienten mit einer ASS-positiven Anamnese (s.a.Abb.59)

Patient	Anamnese	g INM/die
Ma.♀	seit 1 Woche 3 x tgl. 1 Kps. »Amuno«	0,075
Ke.♀	seit 3 Wochen 2x tgl. 1 Kps. »Amuno«	0,05
Ve.♀	seit 27.3.71 zusätzlich zu »Colfarit« (tgl. 0,5g ASS) 2 x tgl. 1 Kps. »Amuno«	0,05

Tab.7: Patienten mit einer Indometacin (INM) Behandlung (s.a. Abb.60)

während einer Indometacinbehandlung zeigt ebenfalls mittels des Kollagen-Zentrifugiertests Abb.60 (s.a.Tab.7)

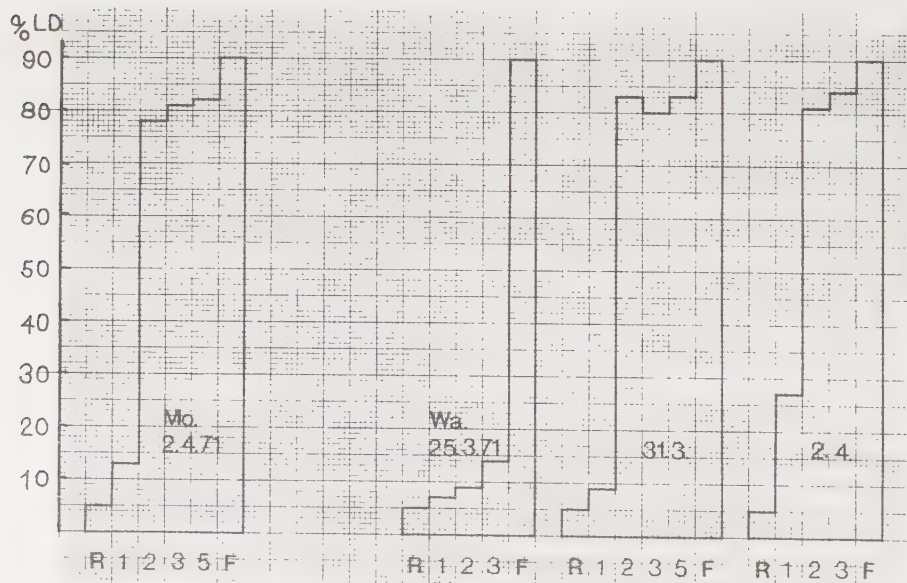
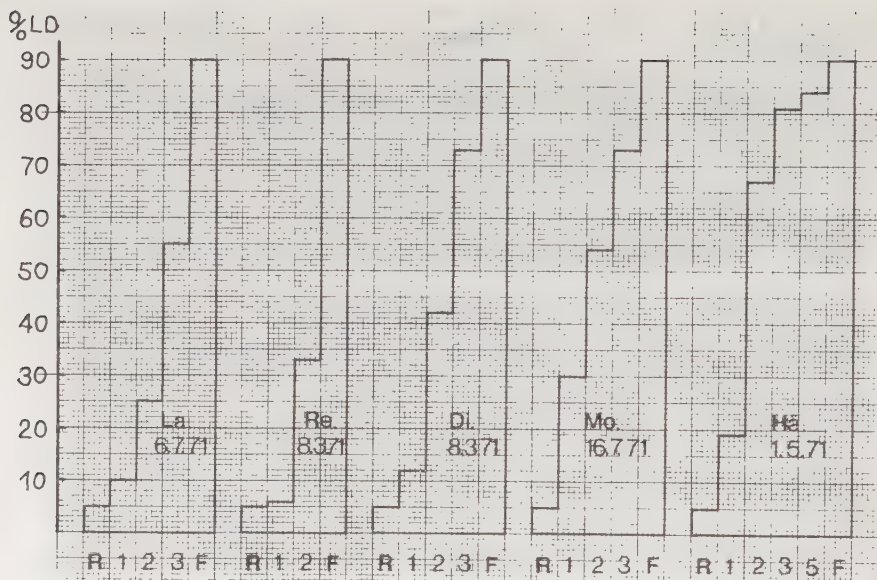


Abb.59: Kollagen-Zentrifugiertest bei 7 verschiedenen Patienten (s.a.Tab.6) mit einer ASS-positiven Anamnese.

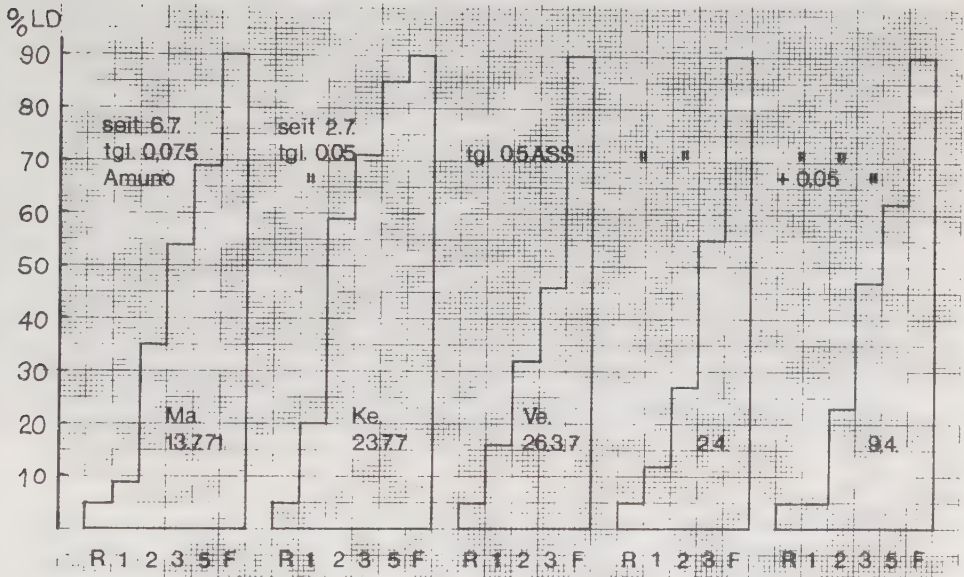
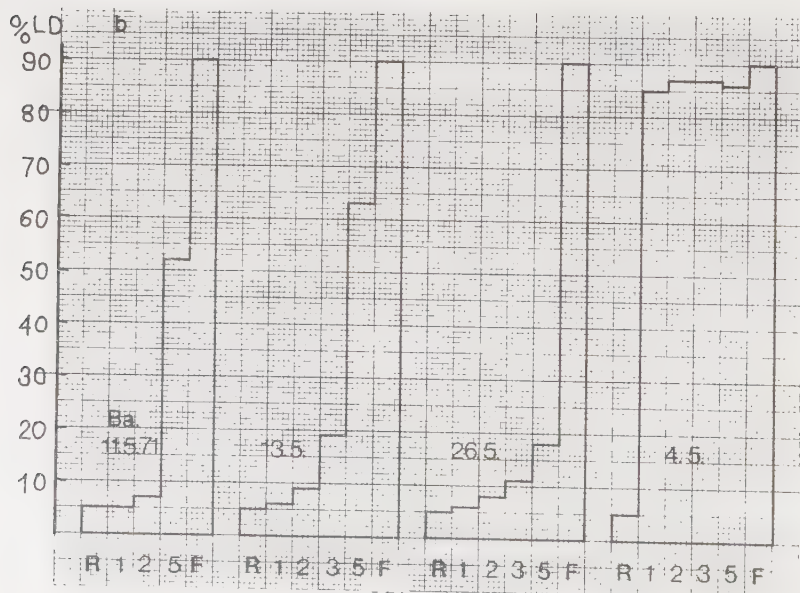
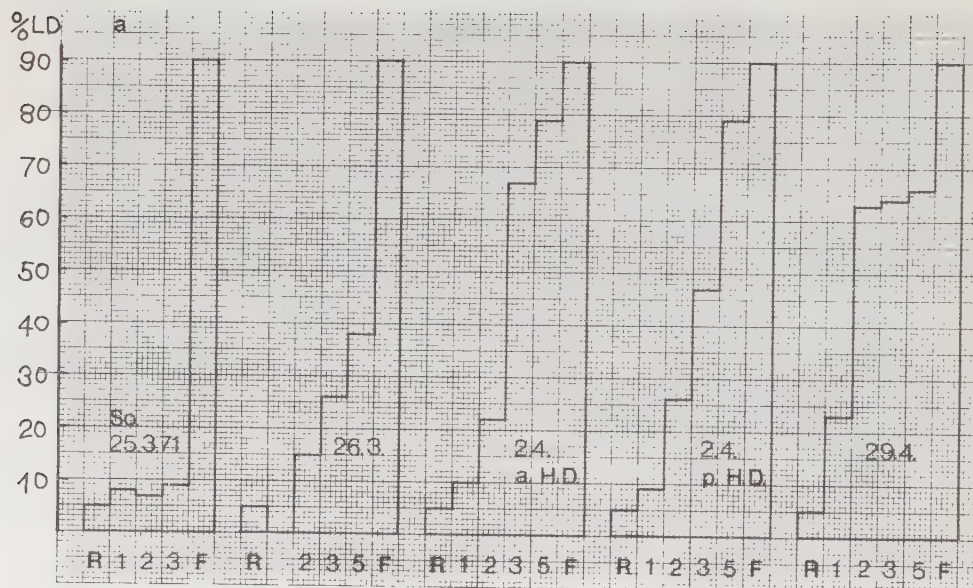


Abb.60: Kollagen-Zentrifugiertest bei 3 verschiedenen Patienten (s.a.Tab.7) mit einer Indometacinbehandlung.

3.5.4. Untersuchung der Plättchen-Aggregation bei einigen Patienten mit schwer verlaufenen, akuten Erkrankungen und bei einigen Patienten mit unklarer Blutungsanamnese

Im Zusammenhang der orientierenden Untersuchungen zu der Frage, wie weit der Kollagen-Zentrifugiertest und die Born-Methode bei Verwendung einer geeigneten Kollagenpräparation die Klinik interessierende Aussagen zur Thrombozytenfunktion erbringen,



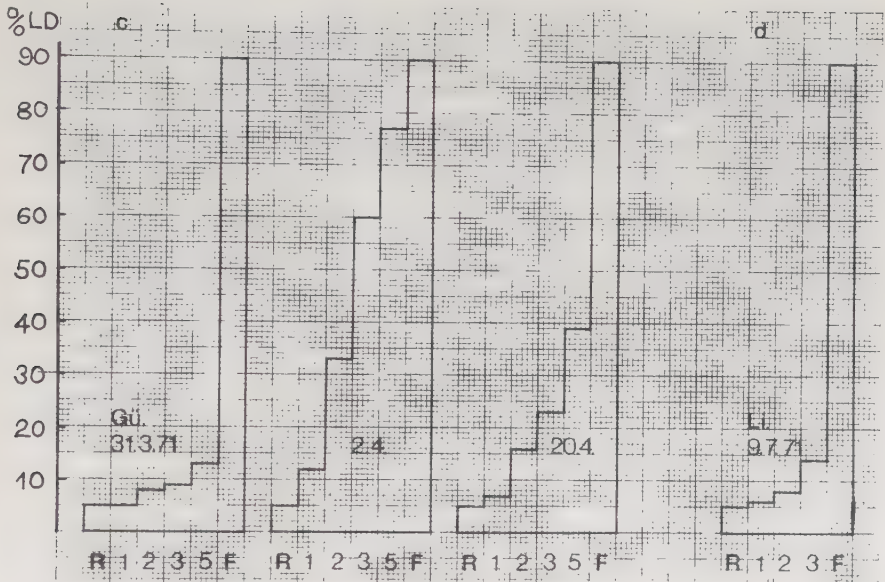


Abb.61a-d: Kollagen-Zentrifugiertest bei 4 Patienten mit schwer verlaufenen, akuten Erkrankungen (s.a.Tab.8).

wurden bei einigen unterschiedlichen Krankheitsbildern die nachfolgenden Befunde erhoben.

Eine erste Gruppe fasst vier Patienten mit schwer verlaufenen, akuten Erkrankungen zusammen (Tab.8, Abb.61a-d). Die Thrombo-

<u>Patient</u>	<u>Erkrankung</u>
So.♀	Seifenabort
Ba.♀	Sepsis
Gü.♀	Sepsis
Li.♂	Kolitis ulzerosa

Tab.8: 4 Patienten mit schwerverlaufenen, akuten Erkrankungen

zyten der Patientin So.♀ (Abb.61a) zeigen am Tag der Einlieferung in die Klinik (25.3.71) ein solch grobgestörtes Aggregationsverhalten, dass im Kollagen-Zentrifugiertest nicht einmal unter der Belastung mit $3\mu\text{g}$ Kollagen pro ml Zitratblut 10% der L.D. erreicht werden. Vom zweiten Tag des klinischen Aufenthalts an bis zur Entlassung dieser Patientin hat sich die Aggregabilität der Plättchen dann zusehends erholt. Vergleicht man übrigens die zwei Messungen vom 2.4.71, welche vor und nach einer siebenstündigen Hämodialyse gemacht worden sind, so findet man hier keine Differenz in der Aggregabilität der Plättchen. Während bei der Messung vom 26.3.71 der $1\mu\text{g}$ -Wert leider verlorenging, zeigt die Aggregationsmessung vom 29.4.71 nochmals ein, bei photometrischer Auswertung des Kollagen-Zentrifugiertestes, für lipämisches Plasma typisches Profil (s.a.S. 33). Obwohl der $2\mu\text{g}$ -Wert hier nur eine L.D. von 63% erreicht, kann man aus dem dichten Beieinanderliegen dieses Wertes mit den 3 und $5\mu\text{g}$ -Werten, die ebenfalls nur eine L.D. von 64 bzw. 66% erreichen, schliessen, dass bereits unter $2\mu\text{g}$ Kollagen pro ml Zitratblut maximale Plättchenaggregation erreicht worden ist.

An den Blutplättchen der Patientin Ba.♀, deren Aggregationsverhalten die Ergebnisse der Kollagen-Zentrifugiertests der Abb.61b wiedergeben, fällt während der ersten drei Wochen des stationären Aufenthalts eine recht konstant erniedrigte Aggregabilität auf, die sich dann in der 4.Woche plötzlich sprunghaft normalisiert. Die Beispiele der Abb.61c und d zeigen ebenfalls erhebliche, z.T. schwankende (c) Störungen der Plättchenaggregabilität beim Vorliegen schwerster, akuter Erkrankungen.

Abb.62 zeigt die Ergebnisse des Kollagen-Zentrifugiertests bei

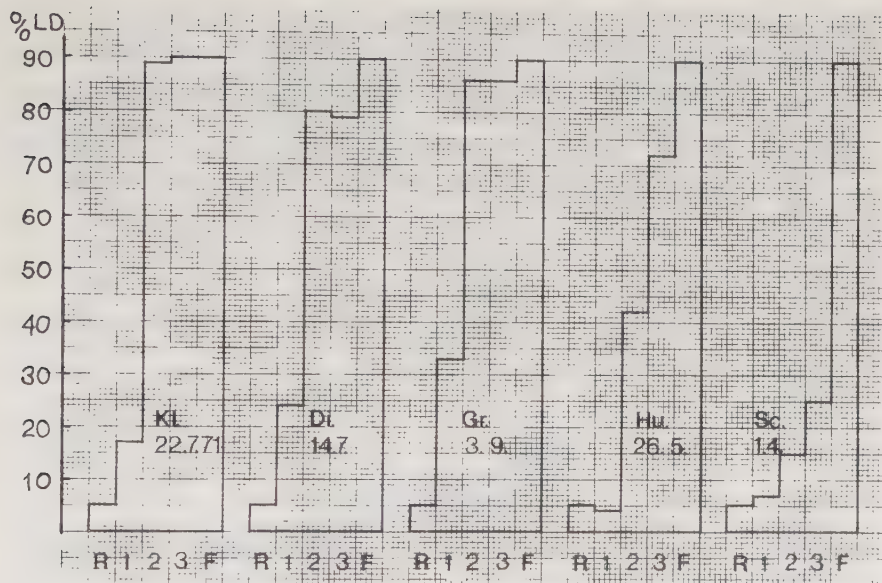


Abb.62: Kollagen-Zentrifugiertest bei fünf verschiedenen Patienten mit unklarer Blutungsanamnese.

fünf weiteren Patienten mit einer unklaren Blutungsanamnese. Während sich eine Störung in der Plättchenaggregabilität der ersten drei Fälle nur unter der Belastung mit 1 μ g Kollagen pro ml Zitratblut erkennen lässt und die 2 μ g-Werte bereits im Normbereich liegen, ist bei den zwei letzten Fällen dieser Patientengruppe die Störung auch unter 3 μ g Kollagen ausgeprägt. Ausser diesem Nachweis eines gestörten Aggregationsverhaltens im Kollagen-Zentrifugiertest und mehrfach verlängerten subaqualen Blutungszeiten, war bei allen fünf Patienten hämostaseologisch kein weiterer auffälliger Befund zu erheben. Bei zwei anderen Patienten mit unklarer Blutungsanamnese konnte

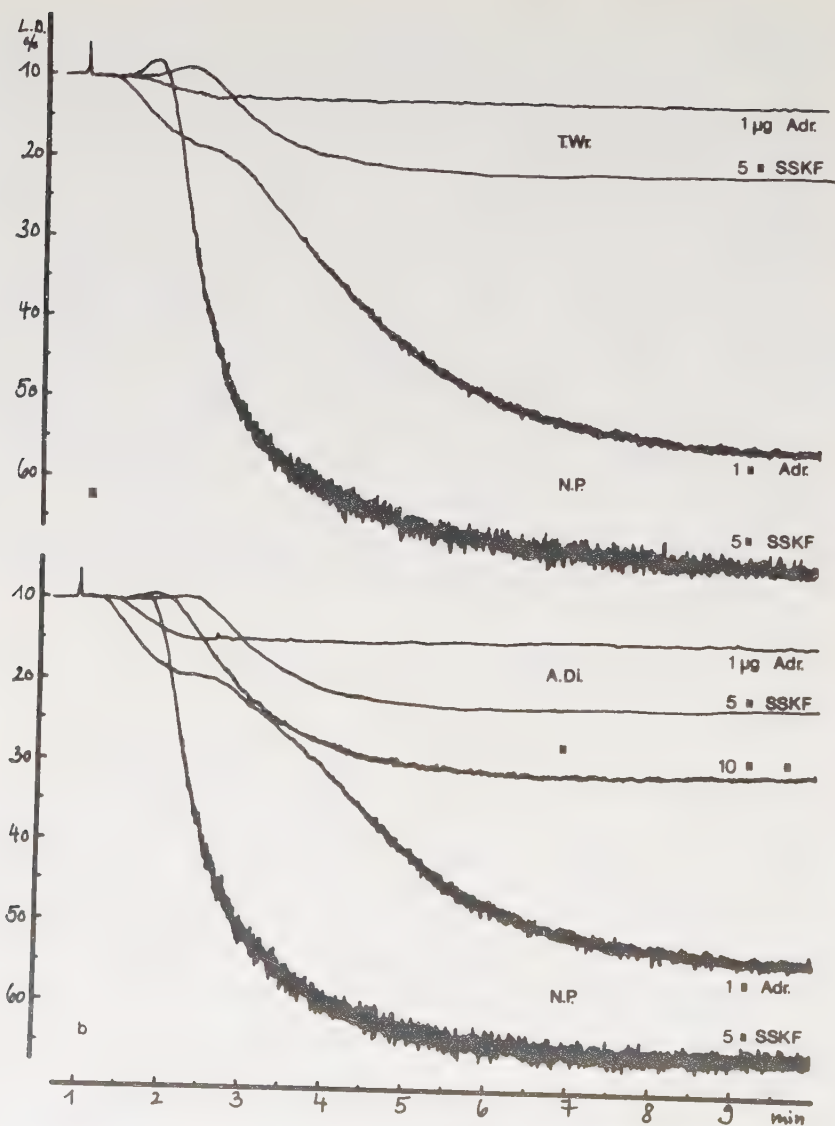


Abb. 63a, b: Aggregationsverhalten zweier thrombozytopathischer PRP im Vergleich zu zwei PRP gesunder Kontrollpersonen (N.P.) unter Verwendung von Adrenalin und Kollagen (SSKF) als Aggregantien im Born-Apparat.

ein pathologisches Aggregationsverhalten der Blutplättchen im Born-Aggregometer unter Verwendung von Adrenalin und Kollagen untersucht werden (Abb.63a,b). In beiden Fällen haben die Thrombozyten der zum Vergleich herangezogenen Kontrollpersonen sowohl unter $1\mu\text{g}$ Adrenalin als auch unter $5\mu\text{g}$ Kollagen in Form von SSKF charakteristisch und ausgeprägt aggregiert. Dagegen blieben bei beiden pathologischen PRP zum einen unter Adrenalin die charakteristische "second wave" aus und zum anderen fiel bei deutlich verlängerter Reaktionszeit neben einem stark reduzierten Aggregationsmaximum das völlige Fehlen einer Aggregationsamplitude unter Kollagen auf. Unter der hohen Dosis von $10\mu\text{g}$ SSKF pro ml PRP (Abb.63b) hat sich dann die Reaktionszeit verglichen mit der Messung unter $5\mu\text{g}$ Kollagen sichtbar verkürzt und die Aggregationskurve weist eine gewisse, wenn auch recht geringe Amplitude auf.

Während im Fall der Abb.63a sowohl das N.P. als auch das pathologische PRP ein ausgeprägtes "swelling" gezeigt haben, ist dieses Phänomen im Fall der Abb.63b bei beiden PRP nur angedeutet (s.a.S.106).

3.5.5. Aggregationsverhalten der Blutplättchen von je drei Patienten mit Thrombasthenie und mit Thrombozythämie - Kollagen-Zentrifugiertest bei drei Geschwistern mit M. v. Willebrand-Jürgens

Im anschliessenden Abschnitt der vorliegenden Arbeit sind Messungen zur Plättchenaggregation bei drei Fällen von bereits nachgewiesener, d.h. bekannter, Thrombasthenie unter Verwendung von SSKF neben Adrenalin und ADP als Aggregantien zusammengestellt.

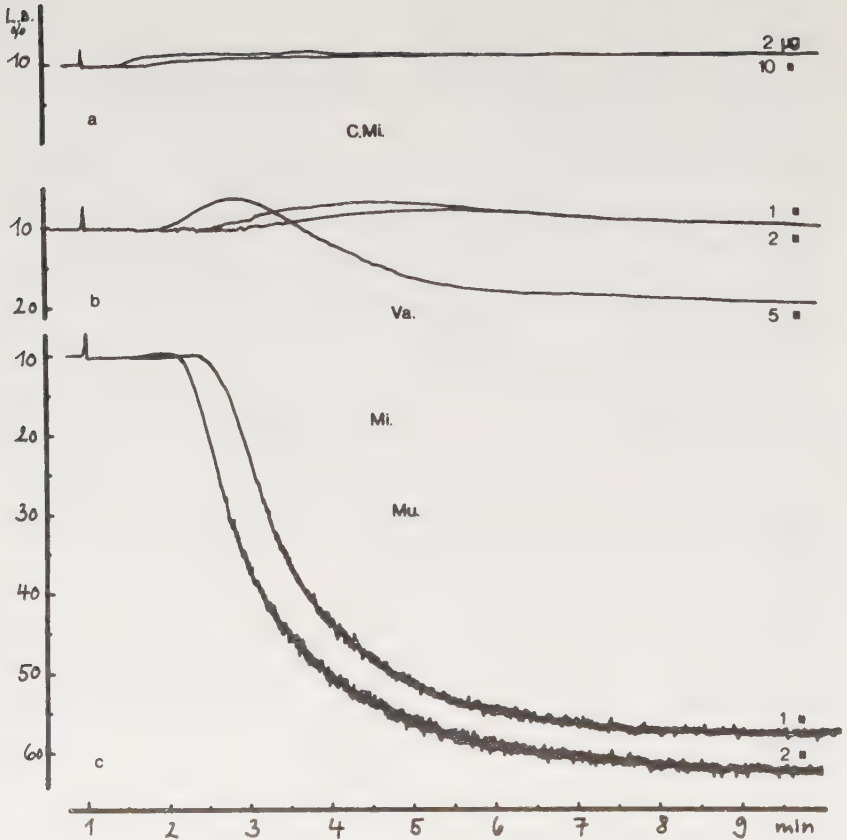


Abb.64a-c: Aggregationsverhalten der Blutplättchen einer thrombasthenischen Patientin (a) sowie von deren Vater (b) und Mutter (c) unter Verwendung verschiedener SSKF-Dosen im Born-Aggregometer.

Die Abb.64a zeigt Aggregationskurven einer 12jährigen , thrombasthenischen Patientin unter Verwendung von 2 und 10µg Kollagen. Es fehlt jegliche Reaktion, selbst ein angedeuteter linearer Anstieg der L.D., der den Rückschluss auf eine Adhäsion

von Thrombozyten am Kollagen zuliesse. Das Aggregationsverhalten der Blutplättchen im PRP des Vaters dieser Patientin unter 1, 2 und 5 μ g Kollagen demonstriert Abb.64b, das der Mutter unter 1 und 2 μ g SSKF Abb.64c. Während das letztere der Norm entspricht, findet sich im Aggregationsverhalten der Plättchen des Vaters eine grobe Störung.

Abb.65a zeigt Aggregationsmessungen, die mit dem PRP einer

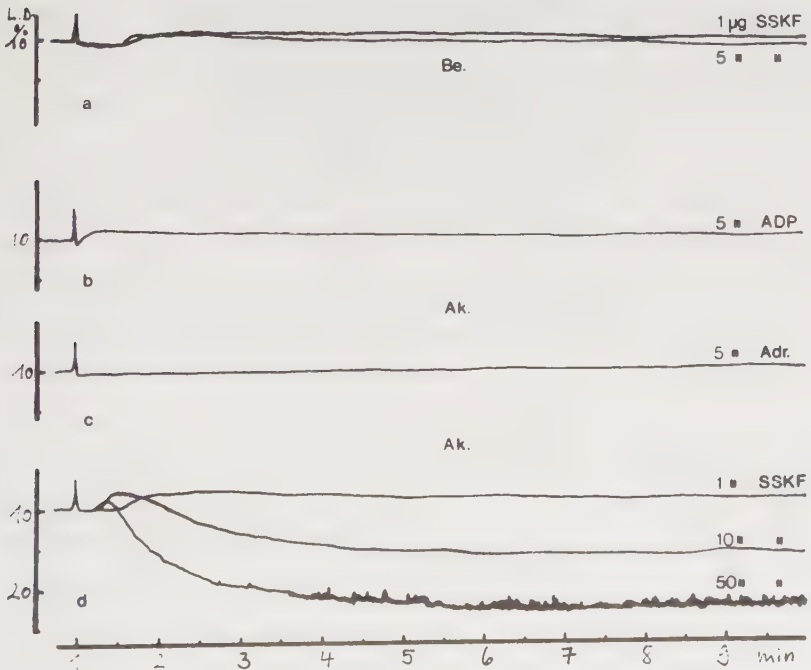


Abb.65a-d: Aggregationsverhalten der Blutplättchen einer thrombasthenischen Patientin unter SSKF (a) und eines thrombasthenischen Patienten unter ADP (b), Adrenalin (c) sowie SSKF im Born-Apparat.

37jährigen, thrombasthenischen Patientin unter Verwendung von

1 und 5 μ g Kollagen erhalten wurden. Im Anschluss an ein ange-deutetes "swelling" bleibt im Born-Apparat eine Aggregation der Plättchen aus und die L.D. verläuft auch in diesem Fall mehr oder weniger geradlinig.

Das dritte untersuchte PRP mit thrombasthenischen Blutplättchen stammt von einem sechsjährigen Knaben. Das Aggregationsverhalten dieser Thrombozyten entspricht im Born-Apparat bei Verwendung von 1 μ g SSKF (Abb.65d) dem zuvor beschriebenen PRP. Mit 10 und 50 μ g SSKF kommt dagegen die Andeutung einer Plättchenaggregation zustande (Abb.65d). Der Versuch, die Plättchen des gleichen Patienten mit 5 μ g ADP zu aggregieren zeigt (Abb. 65b) das Auftreten eines deutlichen "swelling", an das sich keine Aggregation anschliesst, wie es der mehr oder weniger geradlinige Verlauf der L.D. zum Ausdruck bringt. Unter 5 μ g Adrenalin bleibt jede Veränderung der L.D. aus (Abb.65c), vor allem auch die Andeutung einer "first wave". Die thrombasthenischen Blutplättchen der vorhergehenden Patientin haben sich unter ADP und Adrenalin wie die soeben besprochenen verhalten.

Das Ergebnis des Kollagen-Zentrifugiertests bei den beiden letzten thrombasthenischen Patienten unter Verwendung von 1, 2 und 3 bzw. unter 1, 2, 3 und 5 μ g SSKF pro ml Zitratblut gibt die Abb.66 wieder. Während sich in beiden Fällen die 1 μ g-Werte nicht auswerten liessen, liegen die L.Dn. auch bei höherer Kollagenbelastung der Plättchen zwar weit ausserhalb des Normbereichs (s.S.35), zeigen aber mit steigender SSKF-Dosis doch eine gewisse Zunahme.

Einige Untersuchungsergebnisse zum Aggregationsverhalten der Blutplättchen bei drei verschiedenen Fällen von Thrombozythämie sind in einer weiteren Gruppe zusammengefasst. Abb.67a

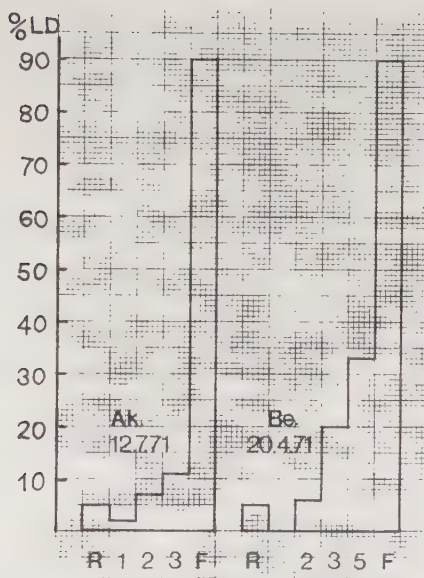


Abb.66: Aggregationsverhalten der Blutplättchen zweier verschiedener thrombasthenischer Patienten im Kollagen-Zentrifugiertest.

gibt die entsprechenden, mit dem PRP des ersten Thrombozythämikers unter Verwendung von 5 und 25 μ g Kollagen im Born-Apparat erhaltenen Messkurven wieder. Die sowohl in Hinblick auf ihr erreichtes Maximum als auch in Hinblick auf ihre Amplitude unter diesen hohen Kollagendosen wenig ausgeprägte Plättchenaggregation weist deutlich auf eine nicht der Norm entsprechende Thrombozytenfunktion hin. Beachtenswert sind im Gegensatz dazu die auffallend kurzen Reaktionszeiten der thrombozythämischen Plättchen mit dem Kollagen, Reaktionszeiten wie man sie normalerweise bei diesen SSKF-Dosen auch erwartet. Ein „swelling“ ist in diesem ersten Fall ausgeblieben.

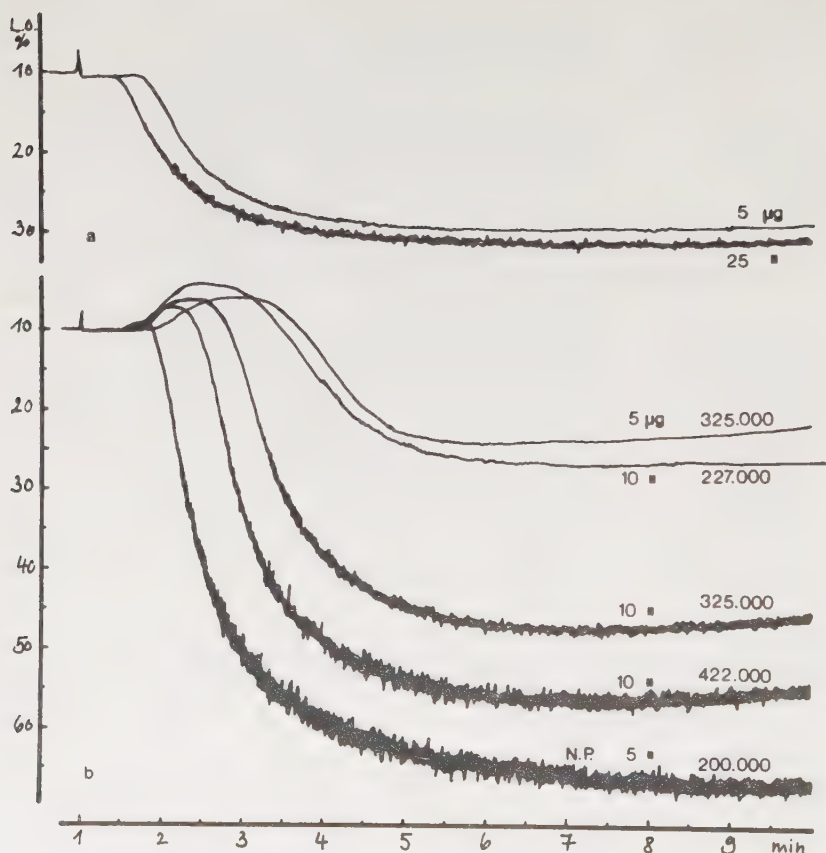
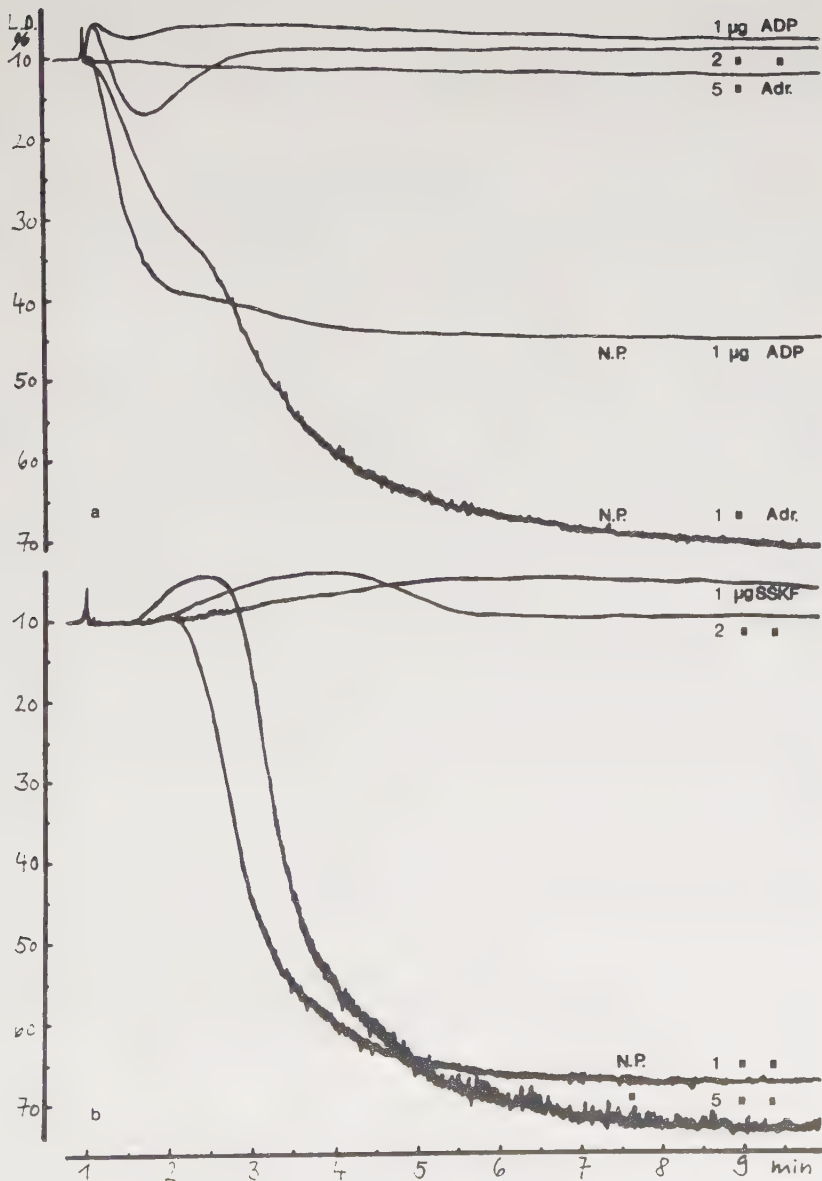


Abb.67a,b: Aggregationsverhalten der Plättchen zweier Thrombozythämiker im PRP unter Verwendung von Kollagen in Form der SSKF als Aggregans.

Gerade das letztgenannte Phänomen erreicht im PRP des zweiten Patienten ein groteskes Ausmass (Abb.67b). Neben der Kollagen-

Abb.68a,b: Aggregationsverhalten der Plättchen eines Thrombozythämikers und einer gesunden Kontrollperson (N.P.) im PRP unter Verwendung von ADP (a) und Adrenalin, sowie unter Kollagen (b) als Aggregantien.



dosis (5 und 10 μ g) ist dieses Mal auch die Plättchenzahl pro cmm PRP variiert worden (227.000, 325.000 und 422.000). Zunächst zeigt der Vergleich mit dem Aggregationsverhalten der Plättchen einer gesunden Kontrollperson (N.P.) die deutlich ausgeprägte Verminderung der Aggregabilität im thrombozythämischen PRP. Diese im Born-Apparat erhaltenen Messergebnisse einer verminderten Aggregabilität thrombozythämischer Blutplättchen verbessern sich zum einen nach Erhöhung der Kollagendosis und zum anderen nach Erhöhung der Plättchenzahl pro cmm.

In der Abb. 68a,b sind schliesslich die Aggregationsergebnisse wiedergegeben, die mit den Plättchen im PRP des dritten Thrombozythämiepatienten erzielt worden sind. Dabei zeigt Abb. 68a die verminderte bzw. gestörte Plättchenaggregabilität unter 1 und 2 μ g ADP und unter 5 μ g Adrenalin verglichen mit den Plättchen einer N.P.. Auch unter ADP fällt im Vergleich zur N.P. ein übermässig ausgeprägtes "swelling" der thrombozythämischen Plättchen ins Auge. Besonders erstaunlich ist jedoch, dass bei Verwendung von Adrenalin nicht einmal 5 μ g dieses Aggregans auch nur die Andeutung einer Plättchenaggregation zustandekommen liess.

Auch die Aggregation dieser Plättchen (Abb. 68b) mit Kollagen kann als Beispiel für die verminderte Aggregabilität der Plättchen eines thrombozythämischen PRP gelten. Besonders auffallend ist wiederum das ausgeprägte "swelling". Während die Reaktion der Blutplättchen mit dem SSKF bei Verwendung von 1 μ g dieses Kollagens über 9 Minuten in der Phase des "swelling" sozusagen "steckenbleibt", kommt letzteres unter 2 μ g SSKF ca. 5 Minuten nach Reaktionsbeginn zum Abschluss, ohne dass sich allerdings an diese zeitweilige Verringerung der L.D. eine Zu-

nahme derselben anschliesst, wie sie als Zeichen einer stattfindenden Plättchenadhäsion oder -aggregation gelten kann. Unter 5µg Kollagen geht schliesslich das ausserordentlich ausgeprägte "swelling" der thrombozythämischen Plättchen nach einer Reaktionszeit von 2 Minuten doch noch in eine ausgeprägte Aggregation der Plättchen über.

Der bei diesem letzten Fall ebenfalls ausgeführte Kollagen-Zentrifugiertest (Abb.69a) zeigt im Gegensatz zur Aggregations-

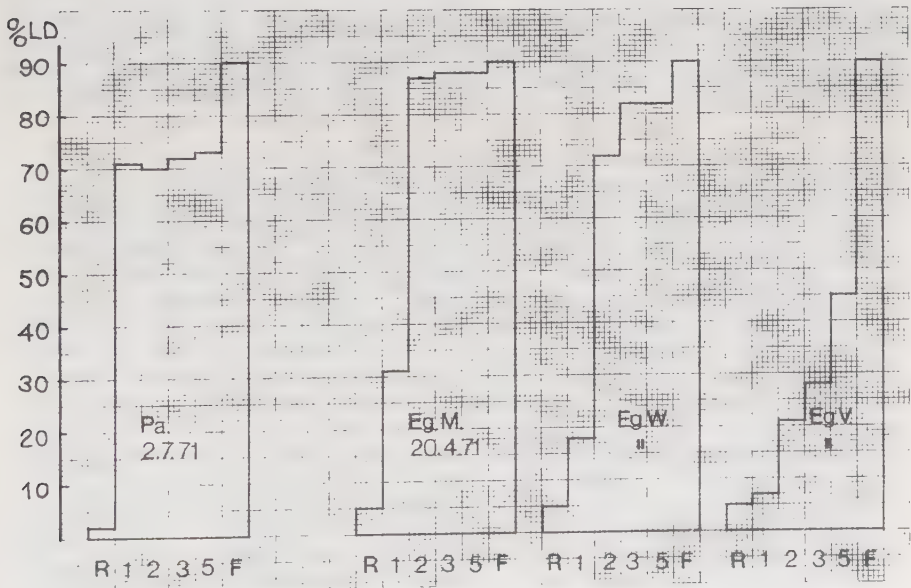


Abb.69a,b: Kollagen-Zentrifugiertest bei einer Patientin mit Thrombozythämie (a) und bei drei Patienten mit M.v. Willebrand-Jürgens (b).

messung nach Born - von seiner lipämischen Charakteristik abgesehen (s.S.33) - scheinbar nicht einmal unter 1µg Kollagen pro ml Zitratblut eine Abweichung von der Norm. Hier sei an

die methodischen Unterschiede der verwendeten Tests kurz erinnert, wonach u.a. im Kollagen-Zentrifugiertest die Plättchenzahl des verwendeten, thrombozythämischen Zitratblutes unverändert geblieben ist, die Plättchenzahl im thrombozythämischen PRP für die Aggregometrie nach Born aber auf 200.000 pro cmm eingestellt wurde.

Die Messung der Plättchenaggregabilität mittels des Kollagen-Zentrifugiertests bei drei Geschwistern mit einem M. v. Willebrand-Jürgens gibt Abb.69b wieder. Der Test weist bei allen drei Patienten Thrombozythopathien unterschiedlicher Ausprägung nach.

3.6. Die retraktionsstimulierende Wirkung sauersuspendierter Kollagenfibrillen (SSKF) auf Thrombozyten

Im Zusammenhang mit Retraktionsstudien (80), die zur gleichen Zeit und im selben Laboratorium betrieben wurden, bot es sich an, zu untersuchen, wie weit sich Kollagen in Form der SSKF als Stimulans von Blutplättchen zu deren Retraktion eignen würde.

Hierzu ist die retraktionsstimulierende Wirkung von SSKF (10, 25 und 50µg pro ml PRP) mit der von Adrenalin (0,01, 0,1, 0,5 und 10µg pro ml PRP) auf die Blutplättchen verschiedener gesunder Kontrollpersonen nach der beschriebenen Methode (s.S.26) verglichen worden. Abb.70a,b gibt als Beispiel zwei derartige Ansätze wieder.

An der adrenalinstimulierten Retraktion fällt auf, dass sie sich bei Verwendung von 0,5µg Adrenalin pro ml PRP maximal ausprägt. Während demgegenüber 10µg Adrenalin die Plättchen deut-

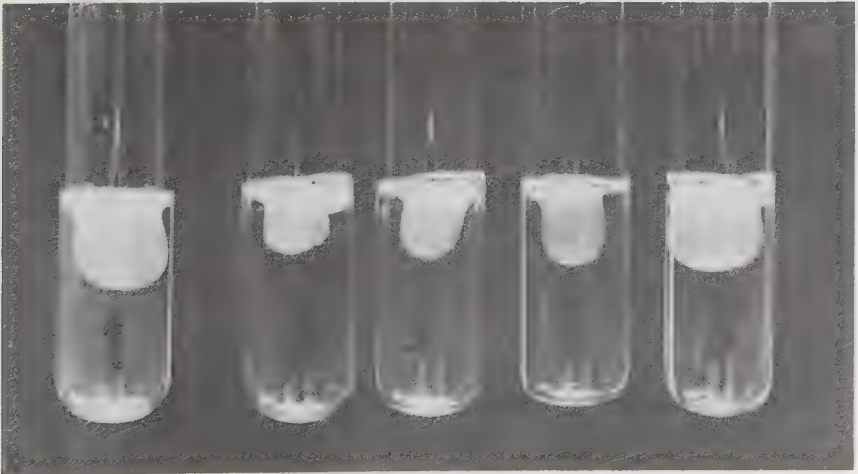
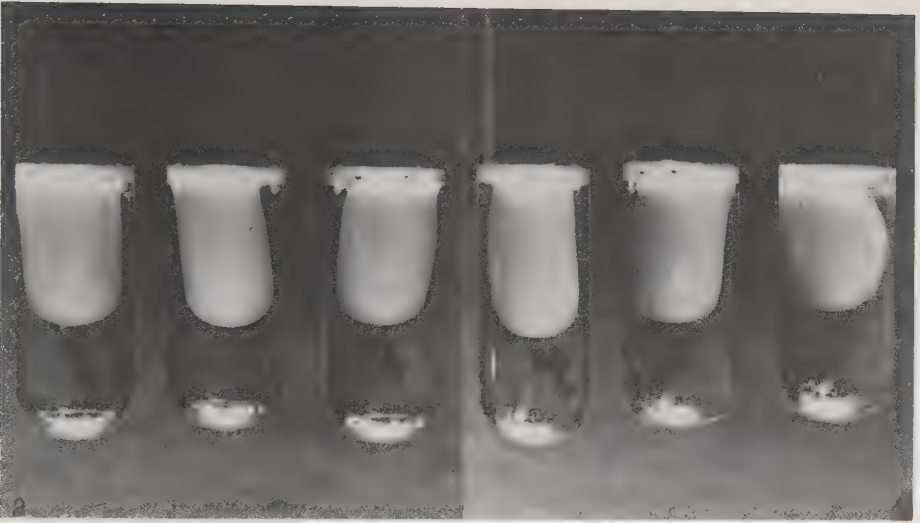


Abb.70a,b: Retraktionsstimulierende Wirkung verschiedener Adrenalindosen (0,01, 0,1, 0,5 und 10 μ g/ml; a) und Kollagendosen (10, 25 und 50 μ g/ml; b) auf die Blutplättchen im PRP einer gesunden Kontrollperson.

lich weniger stimulieren, erscheint es besonders bemerkenswert,

dass selbst 0,01 μ g Adrenalin pro ml PRP noch eine nachweisbare Stimulatorwirkung auf die Retraktion von Blutplättchen ausüben.

Obwohl die Thrombozyten eine derartig hohe Empfindlichkeit bei Verwendung von Kollagen nicht gezeigt haben, hat sich die SSKF auch als brauchbarer Stimulator der Thrombozytenretraktion erwiesen. Bei den vorliegenden Untersuchungen hing die stimulierende Wirkung von der Inkubationsdauer des Kollagens mit den Plättchen ab. Eine halbminütige Inkubation brachte maximale Retraktionsergebnisse. Noch 10 μ g SSKF pro ml PRP konnten im verwendeten Testsystem gut nachgewiesen werden.

Wie Abb.71 zeigt lassen sich Thrombozyten vom Kaninchen mit dem Pferdecollagen in Form der SSKF ebenso stimulieren wie menschliche Plättchen.

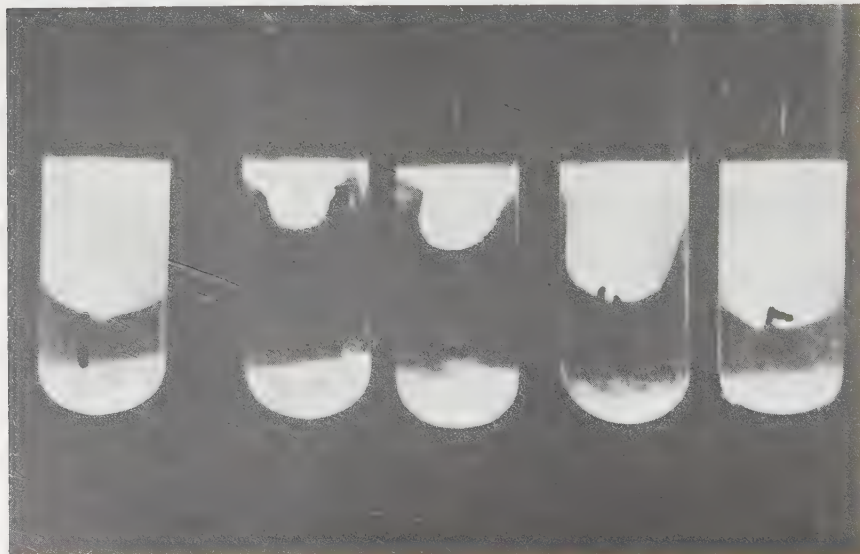


Abb.71: Retraktionsstimulierende Wirkung equinen Kollagens in Form der SSKF (50, 25 und 10 μ g/ml) auf die Blutplättchen im PRP eines Kaninchens.

3.7. Aktivierung des Faktors-XII der Blutgerinnung mit Hilfe von Kollagen

Zu guter Letzt ist im Rahmen der vorliegenden Arbeit noch kurz der aktivierenden Wirkung von Kollagen auf den Faktor-XII, den Hagemann-Faktor, der Blutgerinnung nachgegangen worden. Dazu sind 3ml PFP (plättchenfreies Plasma) von sieben verschiedenen, gesunden Kontrollpersonen jeweils mit 5mg Kaolin, mit 5mg Kollagen in Form von SKP (s.S.15) und für den Leerwert ohne eine zugesetzte Substanz nach der beschriebenen Methode (s.S.27) zur Reaktion gebracht worden. Die im Anschluss an diese 5-, 45-, 90-, 180- und 240-minütige Reaktion mit dem entsprechend aktivierten PFP erhaltenen Rekalzifizierungszeiten sind in Tab.9 zusammengefasst. Die Mittelwerte dieser Rekal-

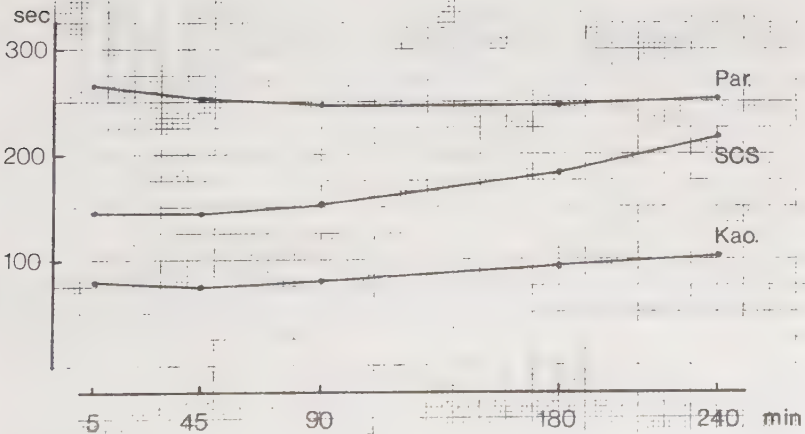


Abb.72: Aktivierende Wirkung von Kollagen in Form der SKP und von Kaolin (je 5mg/3ml PFP) auf den Faktor-XII der Blutgerinnung im Vergleich zu einer Paraffinoberfläche.

Art der Oberfläche	NP	Rekalzifizierungszeiten (sec) nach Reaktionszeiten von je					
		5 min.	45 min.	90 min.	150 min.	180 min.	240 min.
Paraffin	I	223	176	155	171	156	156
	II	277	269	270	240	214	215
	III	269	232	240	241	235	237
	IV	226	240	232	239	270	270
	V	233	217	238	0	223	223
	VI	347	350	320	0	349	365
	VII	294	290	274	0	274	295
	Ø	265	253	247	223	246	252
Paraffin + Kollagen	I	95	100	114	130	142	155
	II	124	137	143	182	204	215
	III	177	170	156	171	196	235
	IV	147	148	152	150	150	183
	V	131	139	144	0	194	220
	VI	200	200	208	0	240	293
	VII	124	124	138	0	149	209
	Ø	145	145	151	157	182	216
Paraffin + Kaolin	I	83	69	78	85	90	93
	II	88	80	76	79	88	65
	III	79	79	77	83	87	103
	IV	79	60	65	74	87	90
	V	65	67	81	0	107	111
	VI	95	94	104	0	116	125
	VII	70	74	78	0	91	104
	Ø	80	75	80	80	95	103

Tab.9: Rekalzifizierungszeiten im PFP sieben (I-VII) gesunder Kontrollpersonen (NP) nach unterschiedlich lang dauernder Aktivierung des Faktors-XII mit Kollagen und Kaolin.

zifizierungszeiten liegen der graphischen Darstellung der Abb.72 zugrunde. Darnach erreicht man mit der verwendeten Kollagenpräparation wohl eine deutliche, wenn auch nicht solch ausgeprägte Aktivierung des Hageman-Faktors wie mit einer glei-

chen Menge Kaolin. Während die Aktivität des Faktors-XII im Leerwert (paraffinierte Oberfläche des Reaktionsgefäßes, keine zusätzliche Oberfläche wie Kaolin oder Kollagen) über vier Stunden annähernd gleich bleibt, vermindert sie sich unter Kaolin und etwas stärker unter Kollagen nach Ablauf der ersten Stunden wieder.

4. Diskussion

Die experimentellen Befunde, aus denen Bounameaux (1959) und Hugues (1960) als erste auf eine Beteiligung des vasalen Bindegewebes -"fibres sous-endothéliales"(15) bzw. "collagène"(52)- am Zustandekommen initialer Thrombozytenaggregate in der frühesten Entwicklungsphase eines "clou hemostatique" schliessen konnten, waren mit Hilfe direkter Untersuchungen in vivo erhoben worden. Nahezu alle weiteren, recht zahlreichen und teilweise auch differenzierten Ergebnisse, die man seit der Entdeckung von Bounameaux und Hugues zwischenzeitlich sowohl zur plättchenadhärierenden bzw. -aggregierenden Wirkung des Kollagens und anderer Aggregantien, als auch zum Mechanismus normaler und gestörter Thrombozytenfunktionen erhalten hat, sind durch Experimente in vitro gewonnen. Diese experimentelle Situation kommt etwa auch im Programm einer "Round-the-table conference on normal and modified platelet aggregation" (Leuven-Brüssel, September 1970) zum Ausdruck, von dessen 39 Beiträgen sich ein einziger (14) mit einer in vivo Methode zur Untersuchung der Thrombozytenaggregation befasst hat. Obgleich dieser einleitende und in aller Kürze aufgezeigte Aspekt für die experimentelle Hämostaseologie wohl hinlänglich bekannt ist, erscheint dessen Wiederholung hier trotzdem nützlich, um an den Rahmen zu erinnern, der die Aussage der eigenen und fremden zur Diskussion stehenden Untersuchungsergebnisse mehr oder weniger begrenzt.

4.1. Die Turbidimetrie der Thrombozytenaggregation im PRP

Mit der Angabe einer praktikablen und zugleich ausdrucksreichen

Methode der turbidimetrischen Aggregationsmessung vor allem durch Born (1962, 1963) sowie durch O'Brien (1962) konnte die breitere Beschäftigung mit quantitativen in vitro Studien zur Plättchenaggregation einsetzen. Sowohl die Born'sche Originalmethode (s.S.19) und deren von nicht wenigen Untersuchern angegebenen Modifikationen (z.B. 2,4, 22, 27, 29, 39, 47, 51, 55, 61, 69, 73, 82, 96, 100, 104, 107, 126), als auch eine Methode nach Heinrich u. Róka (1969), welche die Aggregation von Blutplättchen ebenfalls turbidimetrisch mit einem Fotometer erfasst, messen diese charakteristische Thrombozytenleistung im plättchenreichen Plasma.

Bereits Born u. Hume (13) hatten in einer diffizilen Untersuchung gefunden, dass die Zunahme der Lichtdurchlässigkeit (L.D.) in der Küvette des Aggregometers zwei Ursachen hat: Die Bildung der Plättchenaggregate selbst sowie deren Zunahme an Dichte. Dabei beginne die Bildung der Aggregate bereits bevor irgendeine Veränderung in der Lichtdurchlässigkeit der Aggregationsküvette einsetze. Nach dieser Untersuchung ist die Anfangsgeschwindigkeit, mit der die L.D. zunimmt, auch kein Mass für die Bildungsrate kleiner Plättchenaggregate aus Einzelplättchen, sondern vielmehr ein Mass für die Bildungsrate grosser Plättchenaggregate aus kleinen.

Heinrich u. Róka (43) weisen daraufhin, dass bei der Born-Methode die fortlaufend gemessene Transmissionsrate, i.e. das fortlaufend durch die Küvette tretende Licht in % der Lichtdurchlässigkeit (L.D.) des entsprechenden PFP, sowohl von den jeweils vorhandenen einzelnen Plättchen, als auch von den bereits gebildeten Plättchenaggregaten abhängt. Deshalb ergebe sich weder eine direkte Beziehung der optischen Dichte zur Plättchenaggregation, noch zu den nicht aggregierten Einzel-

plättchen.

Auf die Frage, was der optische Plättchenaggregationstest nach Born tatsächlich misst, ist auch Hugues (57) eingegangen. Er stellt dabei fest, dass die fotometrische Technik die plättchenaggregierende Wirkung einer Substanz nicht genau wiedergebe. In die Transmissionskurve gehen zwei Grössen ein: der Abfall der Zahl freier Thrombozyten und der Anstieg der Zahl und der Grösse gebildeter Thrombozytenaggregate. Subtrahiert man von der summarischen L.D.-Kurve die Transmission, in welche lediglich der Abfall der Einzelplättchen eingeht, so ergibt sich nach Hugues eine theoretische dritte L.D.-Kurve, die mit der tatsächlichen Aggregatbildung übereinstimme und der wirklichen Plättchenaggregation entspreche. Im Gegensatz zur summarischen Transmissionskurve zeige diese letztgenannte berechnete Kurve im ersten Fünftel ihres zeitlichen Ablaufs einen Abfall der Lichtdurchlässigkeit. Im 2. und 3. Fünftel laufen die Transmissionsraten beider Kurven etwa parallel, wogegen dann im 4. und letzten Fünftel des zeitlichen Ablaufs die L.D. der Kurve, welche ausschliesslich die Bildung der Thrombozytenaggregate im System wiedergibt, sehr viel steiler zunimmt, als dies in der summarischen Kurve zum Ausdruck kommt.

Wie Hugues findet auch Gross (38) eine gewisse Übereinstimmung zwischen dem Anstieg der Lichttransmission (L.D.) und den in der Zählkammer unter dem Phasenkontrastmikroskop ermittelten Zahlen freier Plättchen im Verlauf des optischen Plättchenaggregationstests. Dabei ist die Thrombozytenzählung in der Frühphase der Aggregation empfindlicher als die Turbidimetrie. Bei kontinuierlicher Beobachtung der Plättchenaggregation findet auch Gross in der Zählkammer bereits zu einem Zeitpunkt erste Thrombozytenaggregate, zu dem

sich die L.D. noch nicht verändert hat.

Die eigenen Erfahrungen, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durch wiederholt vorgenommene vergleichende Untersuchungen synchron zum Born-Test mit Hilfe der Phasenkontrastmikroskopie gewonnen werden konnten (s.S.67), haben ebenfalls gezeigt, dass unabhängig vom verwendeten Aggregans das Auftreten der ersten, kleinen und lockeren Plättchenaggregate die L.D. des getesteten PRP noch nicht messbar verändert. Dies gilt in gleicher Weise für die Thrombozyten-Fibrillen Adhärates (s.Abb. 35b), die nach der Zugabe von Kollagenfibrillen zum PRP vor einer Aggregatbildung auftreten.

O'Brien weist in einer Mitteilung (95) daraufhin, es sei vor allem wichtig zu berücksichtigen, dass der optische Plättchenaggregationstest mit PRP arbeitet, weshalb sich die Frage stellt, welche Plättchen man dabei überhaupt untersucht. So fand er im PRP nach dessen Präparation und vor der Aggregation zuweilen Plättchenverluste bis zu 30% gemessen an der Thrombozytenquantität der verwendeten Vollblutprobe. Im Verhalten der Plättchenleistungen von PRP ohne und PRP mit derartigen Verlusten konnte O'Brien in seinen Untersuchungen keine Unterschiede finden. Befunde über Plättchenverluste bei der Präparation von PRP durch Zentrifugation werden von Caen (25) bestätigt.

Born u. Cross (12) geben zur Reproduzierbarkeit der turbidimetrischen Aggregationsmessung von Blutplättchen an, dass die in gleichen Testansätzen erreichte Zunahme der Lichttransmission (L.D.%) um weniger als 5% differiere. Mit dieser Angabe stimmen die Ergebnisse der eigenen Messungen vor allem dann gut überein, wenn die Dosierung des Aggregans ausreichend hoch

liegt. Born u. Cross deuten ferner kurz an, dass beim Vorliegen einer Lipämie die Trübung des plättchenreichen Plasmas störend überlagert ist (12). Die Trübung lipämischen Plasmas beruht auf einer Lichtstreuung an Lipoproteinen, insbesondere Prä-Beta-Lipoproteinen, sowie an Chylomikronen (64). Im Verlauf der eigenen Untersuchungen ist aufgefallen, dass ein stärkeres Schwerfeld, wie es während der Präparation von PFP bei 3800g über 20 Minuten wirksam wird, eine lipämische Trübung der verarbeiteten Plasmen beeinflusst. In weitgehender Unabhängigkeit von der Temperatur in der Zentrifuge beobachtet man nach abgeschlossener Zentrifugation im frischgewonnenen PFP ausgefallene Fettschlieren. Dadurch differiert die Lipämie bedingte Trübung des PRP nun von der des ungleich trüben, weniger homogen suspendierte Fettpartikel enthaltenden PFP. Da dessen Lichtdurchlässigkeit aber als Bezugsgrösse für die stattfindende (Born-Test) bzw. stattgehabte (Kollagen-Zentrifugier-

Lfde. Nr.	Beschreiber	Präparations-Charakteristik
1.	Zucker u. Borelli 1962	"connective tissue suspension": Fraktion aus dem Homogenat von ca. 0,2g Fettgewebe in 3ml einer 0,9%igen NaCl-Lösung
2.	Hovig 1963	"tendon extract": Überstand einer Suspension von 4g in 50 ml 0,9%iger NaCl-Lösung
3.	Hugues u. Lapiere 1964	"gereinigtes, repolymerisiertes Kollagen": Lösung von Kollagen in 0,1%iger Essigsäure
4.	Spaet u. Zucker 1964	"connective tissue suspension": Fraktion aus dem Homogenat von 1g Fettgewebe pro 1ml endgültiger Suspension in isotoni-scher Salzlösung

Tab.10: Übersicht über verschiedene, in der hämostaseologischen Zubereitungen.

test) Plättchenaggregation dient, wird im Fall einer Lipämie auch bei Anwendung stark aggregierender Dosen die erwartete maximale Plättchenaggregation, ausgedrückt als Zunahme der L.D. in % der Lichtdurchlässigkeit des entsprechenden PFP, scheinbar nicht erreicht. Deshalb empfiehlt es sich bei der Anwendung turbidimetrischer Methoden zur Erfassung einer Thrombozytenaggregation zu berücksichtigen, dass resorbierte Chylomikronen normalerweise im Nüchternblut fehlen, wenn die letzte Mahlzeit vor der Blutentnahme ca. zwölf Stunden zurückliegt (64).

4.2.1. Unterschiedliche Kollagenpräparationen für die Aggregation von Blutplättchen im PRP

Eine vergleichende Übersicht über Kollagenpräparationen, die verschiedene Autoren für die Untersuchung der Thrombozytenadhäsion und -aggregation angegeben haben, vermittelt die Tab.10.

Kollagen-Quelle	Dosierung pro 1ml plättchenhaltigem Ansatz	Lagerung
subkutanes Fettgewebe (Mensch)	0,5ml unverdünnte oder mit isotonischer Salzlösung verdünnte Suspension	bei -20°C
Sehnen (Kaninchen) oder kommerz.Kollagen ⁺	0,2 - 0,4ml	bei 4°C
Haut (Ratte, Kalb Meerschweinchen)	mit Phosphatpuffer verdünnte Stammlösung (z.B.1:5), davon etwa 300µg in 80µl	
subkutanes Fettgewebe (Mensch)		

Lfd. Nr.	Beschreiber	Präparations-Charakteristik
5.	Tangun u. Caen 1965	Überstand eines Homogenates in "sérum physiologique tamponné"
6.	Hardisty u. Hutton 1966	Essigsäure Extrakt
7.	O'Brien, Heywood u. 1966 Heady	Filtrat einer Suspension in Salzlösung
8.	Legrand, Caen u. 1967 Robert	"säurelösliches, gereinigtes Kollagen": in 0,1m Essigsäure (ph 3,5) extrahiert und 2 Mal dialysiert
9.	Wilner, Nossel u. 1968 Le Roy	sauere Dispersion gegen 0,02m Na_2HPO_4 dialysiert
10.	Thomas 1968	Suspension in 0,154m NaCl-Lösung
11.	Heinrich u. Roka 1969	"Prokollagen": mit Säure extrahiert und in NaCl-Zitrat (1 ad 10) gelöst
12.	Horowitz, Stein et 1970 al.	Überstand einer Suspension von 1g in 50ml isotonischer Salzlösung
13.	Rabiner u. Molinas 1970	Überstand des Homogenats von 0,5g in 25ml gepufferter Salzlösung
14.	v.Kaulla u. Thilo 1970	1,5mg suspendiert in 1,5ml 0,9%ige NaCl-Lösung
15.	Baele, Bogaert u. 1971 Barbier	1g suspendiert in 20ml isotonischer Salzlösung
16.	Holmsen 1971	Suspension in 0,1%iger Essigsäure
17.	Murakami, Otake et 1972 al.	Überstand einer Suspension von 20mg in 1ml Salzlösung
18.	Roschlau u. Gage 1972	Extrahiert mit 0,154m Ammoniumbikarbonat (5mg/ml)

Tab.10: Fortsetzung

Kollagen-Quelle	Dosierung pro 1ml plättchenhaltigem Ansatz	Lagerung
Achillessehne (Mensch)		bei -200°C
Achillessehne (Onagar u. Mensch)		Suspension ph7,35; -200°C
Sehnen (Mensch)		Portionen 22ml; -200°C
Haut (Kalb)	20-70µg in 0,1-0,35ml, vor der Anwendung mit Michaelis Puffer verdünnt und durch Erwärmen repolymerisiert	in siliko- nisiertem Glas, bei 40°C
Haut, Dura u. Aor- ta (Mensch)	10-25µg in 75µl, nach Re- suspendierung in einer Salzlösung	lyophili- siert, bei -600°C
kommerzielles Kollagen ⁺		frische Susp.f. je- den Test
Haut (Kalb)	80µg in 50µl	
kommerzielles Kollagen ⁺	50µl des auf maximale Ag- gregation eingestellten, verdünnten Überstandes	
kommerzielles Kollagen ⁺		bei -300°C
Korium (Rind)	20µg in 20µl	frische Susp.f. je- den Test
Sehnen (Mensch)	30µl	
kommerz.Kollagen ⁺	500µg	
kommerzielles Kollagen ⁺		bei -600°C
kommerzielles Kollagen ⁺	333µl Überstand	
Sehnen (Rind)	250 u. 500µg gelöst in 0,1ml mit HEPES gepufferter Parker-Lösung	lyophili- siert, bei -200°C

Lfd. Nr.	Beschreiber	Präparations-Charakteristik
19.	Caen, Sultan u. 1971 Michel	kommerzielles Präparat im "Agregatest" Set, Laboratoire Stago, Asnières s. Seine, entwickelt aus 8. (s.a.dort), identisch mit dem SLK(St) der Tab.5 dieser Arbeit
	Kubisz u. Suranova 1970	
	De Gaetano, Vermeylen 1971 u. Verstrate	
	Salzman u. Levine 1971	
	Caprino, Borrelli u. 1973 Falchetti	
20.	vorliegende Untersuchung	"sauere Suspension kollagener Fibrillen (SSKF)": 1mg in 1ml saurer(ph3) Suspension (Stammsuspension)
21.	seit März 1973 bei verschiedenen Untersuchern in Anwendung	kommerzielles Präparat: "Kollagenreagens Horm" der Fa. Hormon-Chemie, München, entwickelt aus 20.

Tab.10: Fortsetzung

Wie diese Tabelle zeigt, sind als Quelle für die Herstellung kollagenhaltiger Präparationen vornehmlich Sehnengewebe und Korium der Haut, besonders bovinen und humanen Ursprungs sowie auch von anderen Säugern herangezogen worden. Für die Verwendung von Sehnengewebe spricht der kaum in einem anderen Gewebe höher liegende Kollagengehalt von bis zu 93% des Trockengewichts (84). Dem steht allerdings eine nicht gerade einfache präparative Zugänglichkeit der Säugersehne gegenüber. Als recht erwägenswerte Alternative scheint die Dura, ein ebenfalls sehr kollagenreiches Gewebe, bei der Entwicklung gut geeigneter Kollagenpräparationen erstaunlich wenig Beachtung gefunden zu haben.

Kollagen-Quelle	Dosierung pro 1ml plättchenhaltigem Ansatz	Lagerung
Haut (Kalb)	20µg in 0,1ml	lyophilisiert, bei 4°C
	20µg	
	20µg	
	100µg	
	40µg	
Achillessehne (Pferd)	1-2µg in 5-10µl verdünnter Stammsuspension	Portionen 5ml, bei 4-6°C
Achillessehne (Pferd)	3-8µg	Stechampullen à 5ml, 4-6°C

⁺ der Fa. Sigma Chemical Corp., St.Louis,Mo., USA

Ein direkter Vergleich der thrombozytenaggregierenden Wirksamkeit der einzelnen Kollagenzubereitungen scheidet schon wegen der, kaum bei zwei verschiedenen Untersuchern übereinstimmenden Testbedingungen (Verdünnung des PRP, verwendete Volumina und Plättchenzahl, U/min des Aggregometers etc.), aus. Vergleicht man trotzdem die Dosierungen, in denen die jeweiligen Kollagenpräparate verwendet worden sind, bzw. verwendet werden, so lassen sich dennoch größere Rückschlüsse ziehen. Hierzu kann man die Beispiele der Tab.10 drei Gruppen zuordnen, von denen sich schliesslich nur die letzte für weitere Vergleiche eignet:

- I. keine Angaben zur Kollagendosierung,
- II. Dosierung durch Volumina (ml,µl) ausgedrückt,

III. Dosierung durch Mengen (mg,µg) ausgedrückt.

Die Beispiele, die in die letzte Gruppe passen, sind noch einmal gesondert in der Tab.11 zusammengestellt. Diese Zusammen-

Lfd. Nr.	Dosierung pro 1ml plättchenhaltigem Ansatz	Kollagen-Quelle
15.	500µl	T; bovin
3.	300"	K; "
18.	250, 500"	T; "
19.	20 - 100"	K; "
8.	20 - 70 "	K; "
14.	20 "	K; "
9.	10 - 25 "	K; "
21.	3 - 8 "	T; equin
20.	1 - 2 "	T; "
K: Korium der Haut; T: Sehngewebe		

Tab.11: Zusammenstellung der Beispiele aus Tab.10, die genauere Angaben zur verwendeten Kollagendosis machen.

stellung ist ihrerseits in drei Gruppen unterteilbar, in denen die Kollagendosen jeweils um eine bzw. um zwei Zehnerpotenzen differieren. Dabei hat es den Anschein, dass der gewählten Kollagenquelle möglicherweise weniger Bedeutung zukommt, als dem Grad des erreichten Kollagenaufschlusses durch die angewendete Präparationstechnik. So erbrachten z.B. die eigenen Versuche mit resuspendierten Lyophilisaten der SSKF (Nr.20. in Tab.10) oder SLK(St) (Nr.19. in Tab.10) Plättchen zu aggregieren keine befriedigenden Ergebnisse. Der für eine genügende Reproduzierbarkeit der aggregierenden Wirkung erforderliche Resuspensionsgrad hat sich, wenn überhaupt, dann nur mit zu grossem Aufwand erreichen lassen.

Unter den in Tab.10 gegenübergestellten Präparationen fällt die SSKF als besonders wirksames kollagenes Aggregans auf, das

bereits in einer Dosis von 1-2 μ g per Milliliter PRP dessen Thrombozyten eindrucksvoll zu makroskopisch erkennbaren Plättchenaggregaten verklumpt. Dies verdient besonders auch unter dem Aspekt Beachtung, dass demnach Quantitäten eines Skleroproteins von 10-6g, dessen geeignete Präparation vorausgesetzt, durch ihre biologische Aktivität mit Hilfe einer geeigneten Testreaktion wie der äusserst sensiblen Plättchenaggregation nachzuweisen sind. Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zeigen, dass Kollagen in der Präparation der SSKF als Thrombozytenaggregans der Dosis-Wirkung von ADP und Adrenalin kaum nachsteht (z.B. Abb. 15c, 23a,b, 24, 29a,b).

Die Volumina, in denen die unterschiedlich präparierten Kollagene der Tab. 10 zu 1ml thrombozytenhaltigem Testansatz gegeben werden oder gegeben worden sind, rangieren zwischen 0,005 und 0,5ml:

500, 400, 350, 200, 100 μ l
80, 75, 50, 33, 30, 10 μ l
5 μ l

Als einzige Zubereitung wird die verdünnte bzw. unverdünnte (1 μ g=1 μ l) SSKF in Volumina von 5 bis 10 μ l den Testansätzen zugefügt. Diese vergleichsweise kleinen Volumina sind in den vorliegenden Untersuchungen zum einen angestrebt worden, um die im Aggregometer eingestellte L.D. (Lichtdurchlässigkeit) des zu testenden PRP nicht zu beeinflussen und gleichzeitig das Plasmamilieu der ohnehin genügend artefizierten Thrombozyten möglichst wenig zu verdünnen sowie zum anderen um die natürliche Pufferkapazität des Plasmas bei Verwendung einer saueren Suspension auch mit Sicherheit nützen zu können.

Als kardinal darf die Eigenschaft des Skleroproteins Kollagen gelten, dass dessen Monomere im Milieu eines physiologischen pH und physiologischer Ionenstärken polymerisieren. Demnach

sollte es an sich unerheblich sein, ob einem thrombozytenhaltigen Testansatz bereits Kollagenpolymere zugegeben werden, oder ob sich diese unmittelbar nach der Zugabe von monomerem Kollagen aus diesem bilden (s.a.Abb.37b).

Dass die SSKF als Kollagenreagens »Horm« zur Untersuchung kollageninduzierter Plättchenaggregation nicht nur im Born-Test und im Kollagen-Zentrifugiertest, sondern auch im Aggregometer nach Heinrich u. Róka (44) sowie im PATIII nach Breddin (18) gutes leistet, kommt der Konzeption von R.Marx entgegen, wonach die experimentelle Erfassung komplexen physiologischen Verhaltens nicht mit »dem« Test anzugehen ist, sondern gleichzeitig mit verschiedenen, leistungsfähigen Untersuchungsmethoden.

4.2.2. Die Wirkung verschieden präparierten Kollagens auf die Thrombozytenaggregation im PRP

Bei der Entwicklung einer für das hämostaseologische Labor gut geeigneten Kollagenzubereitung, sind im Rahmen der vorliegenden Arbeit einige Ergebnisse angefallen, die u.a. auch Rückschlüsse auf die Bedeutung der Kollagenphase für dessen aggregative Wirksamkeit zulassen. Die Wirkung der zunächst verwendeten SKP (suspendierte Partikel aus Kollagenfibrillen in Ringer-Zitrat 1ad10) verbesserte sich schlagartig nach dem Ansäuern dieser SKP (s.a.Abb.30, 31). Die teilweise zu Partikeln verfilzten Fibrillen lösen sich in sauerem Milieu voneinander, wodurch sich adhäsionsbereiten Plättchen eine vergrößerte kollagene Oberfläche anbietet. Des weiteren hat es sich gut zeigen lassen, dass das zweiwertige Calciumion den Vernetzungsgrad der verwendeten Fibrillen zu beeinflussen scheint. Ein

optimal wirksames Aggregans ist schliesslich durch die Suspendierung kollagener Fibrillen in ionenfreiem, sauerem Milieu (als SSKF) erhalten worden. Von den ebenfalls geprüften säurelöslichen Kollagenen hat nur der Typ in der turbidimetrischen Untersuchung Thrombozyten beeindruckt (Abb.32u.37b), der sich im physiologischen Milieu fibrillär bzw. fibrilloid rekonstituiert (SLK1). Ein Versuch, die kollageninduzierte Thrombozytenaggregation im Aggregometer durch vorhergehende Inkubation des PRP mit Bruchstücken monomeren Kollagens (SLK(BrCN)) zu beeinflussen, gelang nicht. Zusammengenommen könnten diese Beobachtungen darauf hinweisen, dass die plättchenaggregierende Eigenschaft des Skleroproteins an dessen polymere Struktur und die Oberfläche in der sie sich darbietet gebunden ist. Bekanntlich kann natives Kollagen unter den physiologischen Bedingungen, wie sie für den normalen Ablauf von Plättchenleistungen erforderlich sind, wohl nur in polymerer Form vorliegen.

Harnstoff beeinträchtigt die Polymerisation von Kollagen durch Lösen hydrophober Quervernetzungen und entsprechend behandeltes Kollagen ist in seiner plättchenadhärierenden Wirkung - der Voraussetzung für eine sich anschliessende Aggregation - gehemmt (22). Daraus ziehen auch Legrand u. Pignaud (1971) den Schluss, dass das Vorliegen von Fibrillen entscheidend für die plättchenadhärierende Wirkung von Kollagen zu sein scheint. Die gleichen Autoren erklären ihre eigenen Befunde - gewonnen mit Hautkollagenen von Kälbern und Kalbsembryonen - sowie die Befunde von Bankowski et.al.(1967) - gewonnen mit Bindegewebs-extrakten menschlicher Haut und Aorta -, nach denen der aggregierende Effekt des Kollagens jüngerer Individuen ausgeprägter ist, mit dem höheren intra- und intermolekularen Vernetzungs-

grad reiferer Kollagenfibrillen. Und andere Untersuchungen, welche interessante Veränderungen der plättchenaggregierenden Wirkung monomeren Kollagens nach dessen Behandlung mit Pepsin ($^{125}_{126}$), Dinitrofluorbenzol (125), N-Azetylierung, Diazotierung oder Azetylierung von Carboxylgruppen (125) notieren, gehen vielleicht doch zu wenig darauf ein, wie weit nicht entfernte Telo peptide, blockierte basische oder saure Gruppen letztlich durch eine Beeinflussung der Polymerisationsqualität oder -quantität den veränderten Aggregationseffekt derartigen Kollagens bewirken.

Verschiedene Autoren beschreiben einen Wirkungsverlust ihrer Kollagenzubereitungen auf Thrombozyten nach der Denaturierung, i.e. Zerstörung der Quartär- und Tertiärstruktur, durch Erhitzen ($^{48}_{124, 128}$). In Übereinstimmung mit der Eigenschaft monomeren Kollagens, durch Erwärmen auf 38°C in drei Ketten zu zerfallen (66), verliert entsprechendes Kollagen nach 30 minütiger Einwirkung von 30°C ein wenig und ab 35°C die Gesamtheit seiner plättchenaggregierenden Wirkung (124). Polymeres Kollagen zeigt ein davon etwas verschiedenes Verhalten. Hovig (1963) beobachtete an einer kollagenhaltigen Suspension nach einstündiger Einwirkung von 55°C keinen messbaren Einfluss, jedoch nach 15 minütiger Einwirkung von 60°C bereits den völligen Verlust der Aktivität der suspendierten Fibrillen. Ähnliche Ergebnisse haben auch die vorliegenden, eigenen Untersuchungen gebracht. Danach verlieren die sauer suspendierten Kollagenfibrillen nach einstündiger Erwärmung bei 40°C, als SSKF(H40), zwar einen gewissen Teil ihrer plättchenaggregierenden Potenz. Trotzdem aggregiert 1 µg der SSKF(H40) im Born-Apparat die Plättchen in 1 ml PRP noch recht deutlich (vgl. Abb. 40). Ebenfalls für eine Stunde, jedoch auf 70°C erhitztes polymeres Kollagen, als SSKF

(H70), hat in den untersuchten Dosen seine Plättchenwirksamkeit verloren.

In diesem Zusammenhang scheint ein weiterer Befund dieser Arbeit bemerkenswert, nach dem die zweistündige Erhitzung polymeren Kollagens in trockenem Zustand dessen Attraktivität für Thrombozyten nicht zerstört. Derart behandeltes Kollagen zeigt nach seiner Suspendierung zu SSKF(T140) zwar im Vergleich zur SSKF eine um ca. 75% reduzierte Aktivität (vgl. Abb. 41), jedoch reichen 5 µg SSKF(T140) immer noch aus um in 1 ml PRP eine maximale Thrombozytenaggregation zu erreichen, wie die vollausgeprägten Aggregationskurven beweisen. In der einschlägigen Literatur findet man Angaben, nach denen eine thermische Behandlung trocknen Kollagens bei 135°C keine Veränderung von dessen Röntgenogramm zur Folge haben soll (106). An anderer Stelle wird mitgeteilt, trockenes Kollagen könne ohne Schädigung 210°C vertragen. Eine Erniedrigung der Hitzebeständigkeit werde durch H₂O verursacht, dessen Einlagerung in polymeres Kollagen der Einführung von Weichmachern in Hochpolymere vergleichbar sei (67).

Am Schluss dieses Abschnitts soll festgehalten werden, dass sich in der Hand des Erfahrenen die Aggregometrie von Thrombozyten im PRP als ein wenig aufwendiger, überschaubarer biologischer Test äußerster Sensibilität für die Untersuchung gewisser Fragestellungen der Kollagenforschung anbietet. Dies mag u.a. die Abb. 42 der vorliegenden Arbeit verdeutlichen, wonach sich Mengen von 0,5 und 1 µg polymeren Kollagens an Hand ihrer biologischen Aktivität auf Blutplättchen unverkennbar und voneinander differenzierbar nachweisen lassen.

4.3. Kollagen und andere Aggregantien

Die kurzzeitige Abnahme der Lichtdurchlässigkeit von PRP unmittelbar nach der ADP-Zugabe in die Aggregationsküvette und vor dem Einsetzen des stärksten Anstiegs der Lichttransmission haben Macmillan u. Oliver 1965 beschrieben. Man hat dieses Phänomen als eine Änderung der Thrombozytengestalt von einer Scheibchen- in eine Kugelform gedeutet (72,81) und spricht vom "swelling" der Blutplättchen. Die mit ADP gewonnenen Aggregationskurven der vorliegenden Untersuchung zeigen das "swelling" (z.B. Abb. 13, 14, 15, 17a, 21b, c) individuell unterschiedlich ausgeprägt und die Kurven, die mit den PRP von Abb. 17b und 21a gewonnen wurden lassen es vermissen. Berücksichtigt man hierzu die eigenen Befunde zur Abhängigkeit des "swelling" der ADP-induzierten Thrombozytenaggregation von der Plättchenzahl (s. Abb. 16), kann man darauf rückschliessen, dass jedes PRP ein im Aggregometer erkennbares "swelling" zeigt, wenn im entsprechenden Testansatz nur eine gewisse, individuell differierende Thrombozytenzahl pro cmm PRP unterschritten worden ist.

Während sich das Phänomen des "swelling" in zahlreichen turbidimetrischen Untersuchungen der kollagen-induzierten Plättchenaggregation nicht finden lässt (z.B. Mustard et al. 1967, Packham et al. 1967, Hovig et al. 1968, Wilner et al. 1968, Hugues 1968, Legrand u. Huc 1971, Caen u. Legrand 1971), findet sich an anderer Stelle ein kollageninduziertes "swelling" mehr oder weniger ausgeprägt, bzw. angedeutet (z.B. Thomas 1968, Hugues 1969, Caen et al. 1970, Packham et al. 1973). An dieser Gegenüberstellung fällt auf, dass das Auftreten des "swelling" unter Kollagen nicht von Untersucher zu Untersucher, sondern vielmehr von Untersuchung zu Untersu-

chung zu differieren scheint. Die Erwähnung, dass die Reaktionsphase zwischen PRP und zupipettiertem Kollagen häufiger durch eine geringe Abnahme der L.D. charakterisiert ist, findet sich bei Legrand u. Pignaud (1971). Auch beim Vergleich der eigenen, in dieser Arbeit zusammengetragenen, kollageninduzierten Aggregationskurven fällt es sehr auf, dass ein deutliches "swelling" vorhanden sein kann (Abb.15,20b,c,23d,c, 29a,b, 49a), dass es ebenso fehlen kann (Abb.19,23b, 39,42) und dies nicht nur bei individuell verschiedenen, sondern auch bei identischen PRP (Abb.20a,23a). Obwohl sich die SSKF, die Standard Kollagenpräparation dieser Arbeit, verglichen an den Ergebnissen anderer Untersucher (z.B. ^{22,23,24,51,55,56,70,1}_{83,96,97,117,125}) möglicherweise auch besonders gut zur Darstellung eines kollageninduzierten "swellings" der Thrombozyten im Aggregometer eignet, hat sich noch ^{kein} rechter Ansatz für eine Erklärung des unregelmässigen Auftretens von jenem gefunden. Hierzu lässt sich vielleicht ein neuer Aggregometertyp von Born u. Michal (82) besonders nützlich einsetzen, welcher während eines Aggregationsverlaufs nicht nur turbidimetrisch das die Küvette transmittierende Licht misst, sondern gleichzeitig auch nephelometrisch das vom PRP gestreute Licht als Parameter für eine Formveränderung der getesteten Thrombozyten.

Bei der Verwendung etwa von 0,5, 1 oder 2,5µg ADP als Plättchenaggregans beginnt 10 bis 20 Sekunden nach dessen Zugabe die Lichttransmission der Küvette als Ausdruck einer ablaufenden Thrombozytenaggregation zuzunehmen (z.B. Abb. 14). Diese ist bei unterschwelligen ADP-Dosen reversibel, was in einer mehr oder auch weniger ausgeprägten Desaggregation (neuerliche Abnahme der Lichtdurchlässigkeit, Rückbildung der Kurvenamplitude; s.a. Abb.14,15,22a,25a) zum Ausdruck kommt.

Überschreitet die ADP-induzierte Aggregation eine gewisse Intensität, so antworten die reversibel aggregierten Thrombozyten mit einer inzwischen hinlänglich als "releasing" bekannten Reaktion (S.9). In der Küvette setzt sich daraufhin die Aggregation zu irreversiblen Plättchenaggregaten fort. Dies kann sich in einer "second wave" (73) der entsprechenden Aggregationskurve ausdrücken (s. Abb. 15a, b, 22b, 25b), sofern die zweite Welle bei Verwendung höherer ADP-Dosen nicht wie verschluckt erscheint (z. B. Abb. 14a, 22d). Die ADP-induzierte Plättchenaggregation hängt darüberhinaus erheblich von dem vorgelegten Gerinnungshemmstoff (Abb. 13), von dem zur Einstellung der gewünschten Plättchenzahl verwendeten Verdünnungsmedium (Abb. 22), von der Plättchenzahl pro cmm Testansatz (Abb. 16, 25, 26), von der Calcium- (Abb. 14, 17) sowie der Natrium- und Zitratkonzentration (Abb. 15) ebendort und schliesslich vom "Alter" der Thrombozyten (Abb. 21), bzw. des verwendeten PRP, ab. Gerade auf die letztgenannte Abhängigkeit und ihre Bedeutung ist auch gelegentlich einer Diskussion über die die Turbidimetrie der Plättchenaggregation beeinflussenden Faktoren deutlich hingewiesen worden (75). Entsprechend wichtig ist die Kontrolle der Zeit, die von der Blutabnahme bis zur Präparation des PRP und der Ausführung des Aggregationstestes verstreicht. Und dem ist beizupflichten, dass man in zahlreichen einschlägigen Veröffentlichungen Hinweise auf eine konstante Einhaltung der Zeitabstände zwischen Blutabnahme und PRP-Bereitung, bzw. zwischen letzterer und der Ausführung der Aggregationsmessung zu oft vermissen muss. Mannucci gibt an, die Reaktivität der Thrombozyten auf Aggregantien durchlaufe drei Phasen. Während der ersten 30 Minuten nach der Gewinnung des PRP reagierten jene auf ADP weniger empfindlich, nach 45 bis 90 Mi-

nuten sei die Phase maximaler Reaktivität, die dann in der sich anschliessenden dritten Phase abnehmen soll. Ein interessantes mathematisches Modell für die Turbidimetrie oder optische Testung der Plättchenaggregation hat Cronberg (1971) angegeben. In der entsprechenden Studie untersucht er auch den Einfluss einer zweieinhalbstündigen Lagerung von PRP auf die ADP-induzierte Aggregation von dessen Thrombozyten. Nach der mathematischen Analyse verändert sich in zweieinhalb Stunden die Zahl der aggregierenden Plättchen nicht, deren Klebrigkeit sei jedoch herabgesetzt. Die dazu erhaltenen Aggregationskurven gleichen denen der Abb.21 dieser Arbeit nur bedingt.

Vergleicht man die eigenen Ergebnisse, die sich in der vorliegenden Arbeit auf den Zusammenhang der "Alterung" der Thrombozyten und deren Reaktivität bzw. deren Aggregabilität beziehen, so scheinen die mit ADP gewonnenen Befunde den mit Kollagen gewonnenen teilweise zu widersprechen (Abb.20a,b,21a u. Abb.20c,21b,c). Während die kollageninduzierte Plättchenaggregation in der Küvette des Born-Apparates mit zunehmendem Alter des verwendeten PRP stetig an Intensität verliert - eine weitgehende Kompensation ermöglicht die Erhöhung der Kollagendosis oder der Plättchenzahl pro cmm - , zeigt sich unter ADP ein umgekehrtes Verhalten. Das gemessene Aggregationsmaximum, i.e. die L.D., nimmt im letztgenannten Fall zu, die Potenz zu desaggregieren geht gleichzeitig zurück und mit fortschreitender Alterung kommt es allmählich zum Auftreten einer "second wave" (Abb.21a-c). Diese eigenen Ergebnisse zur ADP-Reaktivität "alternder" Plättchen stimmen mit den o.e. Befunden Cronbergs nicht recht überein und lassen die Reaktionsphasen Mannuccis zumindest weniger scharf voneinander abgrenzbar sowie - sicherlich auch in Abhängigkeit von methodischen Unterschieden - in

anderer zeitlicher Ausdehnung erscheinen.

Die Aggregationskurven, die mit Adrenalin als Thrombozytenaggregans im Born-Apparat zu erhalten sind, kennzeichnet gleichfalls das Phänomen einer "second wave" (90). Letztere ist in ihrer charakteristischen, von der Gestalt einer ADP-induzierten "second wave" differierenden Ausprägung, in den wenigen eigenen Beispielen adrenalininduzierter Plättchenaggregation unter Verwendung einer Standarddosis von $1\mu\text{g}$ mit grosser Regelmässigkeit aufgetreten (Abb.23a-d,24).

Betrachtet man für jedes verwendete Aggregans (ADP, Adrenalin, Kollagen) typische Aggregationskurven dieser Arbeit vergleichend, so fällt eine gewisse Übereinstimmung im zeitlichen Verlauf der "first wave" unter ADP, der "first wave" unter Adrenalin sowie der Reaktion zwischen Kollagen und Thrombozyten (=Adhäsionsphase) ins Auge. Die "first waves" unter ADP in Abb. 15c und unter Adrenalin in Abb.23a-c u. 24 benötigen annähernd die gleiche Zeit, wie jeweils die Reaktion der gleichen Thrombozyten mit Kollagenfibrillen. Die ADP-bedingte "first wave", ihr Pendant unter Adrenalin und die Adhäsion von Blutplättchen an Kollagen haben gemeinsam, dass sich auf den Reiz hin, der in jedem Fall auf die zunächst adhärierenden oder reversibel aggregierenden Thrombozyten ausgeübt wird, deren "release reaction" in der Küvette anschliesst bzw. anschliessen kann. Nach Day u. Holmsen (1971) greifen alle Induktoren eines Thrombozytenreleasing (s.a.Tab.2) trotz ihrer sehr unterschiedlichen Beschaffenheit an der Plättchenmembran an. Zahlreiche Strukturen derselben seien als Rezeptoren für die Release-Induktoren vorgeschlagen worden, das Fibrinogen, β -Globulin, α -Rezeptoren, Membran-ATPase u.a. eingeschlossen. Wahrscheinlich seien zahlreiche, für die einzelnen Release-Induktoren spezi-

fische Membranrezeptoren beteiligt. Die jeweilige Aggregationscharakteristik, wie sie auch in den turbidimetrischen Kurven der vorliegenden Untersuchung im Anschluss an ADP-, adrenalin- und kollageninduzierte Freisetzungsreaktionen zum Ausdruck kommt, mag darauf hinweisen, dass die letztgenannten in ihrer Quantität oder auch in ihrer Qualität vom jeweiligen Release-Induktor abhängen könnten. Und wohl zu Recht meinen Day u. Holmsen (1971), es sei korrekter von "kollageninduzierter release reaction", "ADP-induzierter release reaction" etc. zu sprechen, als in weniger differenzierter Art nur von "release reaction".

An dieser Stelle soll nocheinmal kurz auf das bereits erwähnte und bemerkenswert erscheinende unterschiedliche Aggregationsverhalten "gealterter" Thrombozyten eingegangen werden. Vergleicht man dazu erneut die Kurven der Abb. 20 u. 21, kann man feststellen, dass mit fortschreitender Alterung des PRP die Plättchen unter ADP eine ausgeprägtere "first wave" entwickeln und dass sich dem entsprechend die Reaktionszeit mit Kollagen zusehends verkürzt. D.h. eine Plättchenalterung von zwei bis fünf Stunden fördert sowohl im Fall von ADP als auch von Kollagen die der "release reaction" vorausgehende erste Phase der reversiblen Aggregation bzw. der Adhäsion. Die sich daran unmittelbar anschliessende und durch freigesetzte plättchenständige Substanzen (s.a. Tab. 1) verursachte Thrombozytenaggregation, schwächt sich dagegen im Fall des Kollagens mit zunehmender Plättchenalterung ab, während sie im Fall des ADP überhaupt erst mit deren Fortschreiten und ausgedrückt durch eine zusehends stärker auftretende "second wave" möglich wird. Wie weit diese Befunde möglicherweise aber auch durch die unterschiedlichen Gerinnungshemmer (Zitrat und Heparin in Form von "Calciparin") beeinflusst sind, bleibt zu

klären.

Nach den eigenen Erfahrungen gilt für die Aussagen, welche man durch die ADP-, adrenalin- und kollageninduzierte Aggregation von Thrombozyten in PRP erhält, dass sich die eine nicht durch die andere ersetzen lässt. Davon unabhängig scheint die mit einer gutgeeigneten Kollagenpräparation induzierte Aggregation einige unbestreitbare Vorzüge zu bieten. So lässt sich die erste, dem "releasing" vorausgehende Phase von der, sich an die Freisetzungsreaktion unmittelbar anschliessenden zweiten Phase im gesamten Dosierungsbereich des Aggregans gut abgrenzen. Gerade dies ist im Fall von "first" und "second wave" weniger gut möglich. Während die erste Phase vor allem gewisse Rückschlüsse auf das Adhäsionsverhalten der Plättchen zulässt, kommt in der zweiten Phase deren Aggregationsvermögen zum Ausdruck. In beiden Phasen äussert sich die Abhängigkeit von der gewählten Dosis des Aggregans deutlich und ist gut differenzierbar. So dauert die erste Phase, die Reaktionszeit der Thrombozyten mit Kollagenfibrillen, unter der extremen Dosis von 100µg SSKF im Beispiel der Abb.30 nur 6 Sekunden, und kann sich - wie etwa in den Beispielen der Abb.28 - in einem Dosierungsbereich von 0,5 bis 10µg SSKF zwischen 84 und 30 Sekunden bewegen. Die letztgenannten Beispiele belegen zugleich für die zweite Phase, dass sich bei der Verwendung von Kollagen der Zusammenhang zwischen dessen Dosierung und dem Ausmass der statthabenden Plättchenaggregation - d.h. die Dosiswirkung des Aggregans - recht gut differenzieren lässt.

4.4. Die Messung der Thrombozytenaggregation im Vollblut (Der Kollagen-Zentrifugiertest)

Während Marx und Schweighart bereits 1957 zur Differenzierung einzelner Blutplättchen von Plättchenaggregaten die milde Zentrifugation des betreffenden Vollbluts bzw. PRPs angegeben haben, findet man mit einer Ausnahme (63) in der einschlägigen Literatur bis heute erstaunlicherweise kaum Angaben über eine Anwendung dieser einfachen und naheliegenden Methode eine Thrombozytenaggregation zu erfassen. Als die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit soweit fortgeschritten waren, dass mit der SSKF ein gutgeeignetes, stabiles kollagenes Thrombozytenaggregans zur Verfügung stand, konnte auch R.Marx's altes Konzept eines Kollagen-Zentrifugiertests praktisch angegangen werden. Ein derartiger Test sollte, vor allem für die klinische Routine geeignet, ohne allzu grossen technischen und zeitlichen Aufwand reproduzierbare Aussagen zur kollageninduzierten Thrombozytenaggregation liefern. Wie die entsprechenden, im voranstehenden Abschnitt 3.1.1. mit 3.1.4. zusammengefassten Ergebnisse zeigen, haben sich diese Forderungen mit dem verwirklichten Kollagen-Zentrifugiertest erfüllen lassen.

Schon an den ersten Experimenten zur Entwicklung des neuen Tests war aufgefallen, dass die mit dem Zitrat vorgelegten Kollagenfibrillen nach 15 bzw. 30 minütigem Blutkontakt zusehends an Aggregationskraft verlieren (s.Abb.7). Dieser wichtige Befund lässt sich dahingehend interpretieren, dass Blut eine inhibierende Wirkung auf die thrombozytenadhärierende Potenz kollagener Fibrillen auszuüben vermag. Der Hemmeffekt kommt nach einer allzu kurzen Kontaktzeit nicht zum Tragen, was für eine gewisse Unspezifität der Hemmung sprechen könnte. Ein ähn-

licher Befund findet sich als kurze Mitteilung in der Literatur (88). Darnach ist die plättchenadhärierende und -aggregierende Aktivität von mit Serum behandeltem und anschliessend gewaschenem Kollagen gehemmt. Dieser hemmende Effekt von Serum auf Kollagen ist zeit- und temperaturabhängig. Durch Waschen mit 1,5m NaCl-Lösung soll sich die verminderte Aktivität derart behandelten Kollagens wieder normalisieren lassen. U.a. werde die inhibitorische Plasmakomponente bei 56°C zerstört und sei unterhalb von pH 7 instabil.

Von den beiden Möglichkeiten den Kollagen-Zentrifugiertest auszuwerten ist in der vorliegenden Arbeit der Turbidimetrie vor der Plättchenzählung der Vorzug gegeben worden. Für die Turbidimetrie mag gerade bei mehreren Kollagenbelastungen pro Test sowie dem Fehlen eines zuverlässigen und leistungsfähigen Autocounters die etwas grössere Ökonomie sprechen, nicht zuletzt, weil eine abschliessende Umrechnung der Zahlen restierender Plättchen in Prozent der Plättchenzahl des Leerwertes (unbelastetes PRP) entfällt. Neben dem Vorteil die direktere Methode darzustellen, kommt die numerische Auswertung mit geringeren Plasmamengen, und u.U. auch ohne vorangegangene Zentrifugation, aus. Die für den Kollagen-Zentrifugiertest benötigte Blutmenge wird durch verschiedene Faktoren determiniert. So ist ein gewisses Mindestvolumen unabdingbare Voraussetzung für ein genügend gutes Mischverhalten der Vollblutproben und damit für reproduzierbare Mischergebnisse. Eine weitere Determinante bedeutet z.B. auch die Kalibrierung der im Handel erhältlichen Einmalspritzen, die nach erfolgter Blutabnahme gleichzeitig als Misch- oder Reaktionsbehältnisse zu dienen haben. Schliesslich erfordern die gebräuchlichen Fotometerküvetten zur Turbidimetrie plättchenhaltiger Plasmaproben einen gewissen Fül-

lungsgrad, etc..

Eine bereits erwähnte, dem Kollagen-Zentrifugiertest ähnelnde Methode, scheint bisher nur in einer äusserst knappen Mitteilung beschrieben worden zu sein (63). Danach dürften deren wesentliche Unterschiede zu unserem Test darin bestehen, dass diese Methode nicht für ein definiertes Thrombozytenaggregans ausgearbeitet ist, sowie darin, dass das jeweils verwendete Aggregans zitratisiertem Blut nachträglich zugesetzt und nicht direkt, im Zitrat vorgelegt, dem abgenommenen Blut zugemischt wird.

Es ist gut vorstellbar, dass das milde, fünfminütige Drehmischen (s.S.24) einer Vollblutprobe dessen Erythrozyten durchaus nicht unbeeinflusst lässt. Die hierzu wichtig erscheinende Frage, wie weit grössere oder kleinere Spuren erythrozytären ADP's austreten und möglicherweise die Plättchenaggregation im Kollagen-Zentrifugiertest beeinflussen, musste in den vorliegenden Untersuchungen unberücksichtigt bleiben und vor der experimentellen Klärung gerade dieser Frage dürften auch noch methodische Probleme zu lösen sein. Ebenso ist es, von möglichen Wechselwirkungen zwischen Erythrozyten und entstehenden Thrombozytenaggregaten abgesehen, ungeklärt, ob die im Kollagen-Zentrifugiertest verwendeten Kollagenfibrillen einen Effekt auf die Masse der roten Blutzellen ausüben.

Da sich im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Möglichkeit ergab, experimentelle Erfahrungen mit zwei verschiedenen Methoden der Thrombozytenaggregationsmessung zu sammeln, liegt es nahe die Bornsche Methode und den Kollagen-Zentrifugiertest unter dem einen und anderen Aspekt einander gegenüberzustellen. Der erste und wesentliche Unterschied zwischen beiden Tests besteht darin, dass die aggregometrische(n) Methode(n) PRP

verwendet (verwenden), wogegen der Kollagen-Zentrifugiertest als Vollblutmethode gelten muss. Mit der Blutabnahme verlieren Thrombozyten ihr vitales Milieu. Wertet man das Blut als Organ, kann man weiter schliessen, dass Plättchen im PRP auch ihres organischen Milieus zumindest teilweise verlustig gegangen sind. Wie weit diese theoretische Überlegung für die Thrombozytenleistungen und deren Erfassung in vitro praktische Relevanz besitzt, scheint bis jetzt noch nicht gut bekannt zu sein. Die Methode bringt es mit sich, dass die Blutplättchen im Kollagen-Zentrifugiertest (Modifikationen ausgenommen) unmittelbar nach der Blutabnahme zur Aggregation kommen. Letzteres beansprucht wegen der erforderlichen Vorbereitungen beim Born-Test nach den eigenen Erfahrungen 50 bis 60 Minuten.

Die aussagekräftigen Kurven, die sich mit Hilfe des Born-Apparates von einer kollageninduzierten Plättchenaggregation gewinnen lassen, stellen ein dynamisches Messergebnis dar, das direkt auf die Reaktionszeit zwischen Kollagen und Thrombozyten rückschliessen lässt, das ein u.U. auftretendes "swelling" festhält, das die Bestimmung der Zeit bis zum Erreichen einer maximalen Aggregation ermöglicht und das durch die Oszillationsbreite der Kurve in jeder Phase die Grösse der gebildeten Aggregate andeutet. Dagegen vermitteln die Messergebnisse des Kollagen-Zentrifugiertests gewissermassen im Negativ nur statisch das, was nach einer stattgehabten Plättchenaggregation übrig geblieben ist. Dabei bietet der letztgenannte Test wiederum den Vorteil, in einem Ansatz bis zu vier oder auch mehr Einzelmessungen gleichzeitig möglich zu machen. So können die Thrombozyten eines Probanden in einem Test mit unterschiedlich hohen Kollagendosen belastet werden. Den dabei entstehenden Profilen (vgl. Abb. 53, 54, 55 u.v.a.)

mangelt es wohl auch nicht an einer gewissen Aussagekraft. Die im Abschnitt 3.5.1. (S.90-97) beschriebenen Untersuchungen der kollageninduzierten Plättchenaggregation im zitratisierten Vollblut und im PRP vor und nach einer Azetylsalicylsäure-Behandlung bieten sich für den direkten Vergleich der Born'schen Testmethode mit der des Kollagen-Zentrifugiertests an. Zur besseren Übersicht ist der Vergleich in Form einer Tabelle (Tab.12) angelegt. Bei der Beurteilung der in Tab.12 zusammen-

Tag	Abb. 50/53 Zw.♂				Abb. 51/54 Su.♂				Abb. 52/55 Mu.♀			
	Born		KZT		Born		KZT		Born		KZT	
	µg		µg		µg		µg		µg		µg	
0.	1	+	+	1	1	+	+	1	1	+	+	1
	2	+	+	2	2	+	+	2	2	+	+	2
			+	3			+	3			+	3
	4	+			4	+			4	+		
1.				5			+	5			+	5
	1	-	-	1	1	-	-	1	1	-	-	1
	2	-	-	2	2	-	-	2	2	-	-	2
			-	3			-	3			-	3
2.	4	-			4	-			4	-		
			(-)	5			-	5			-	5
	1	-	-	1	1	-	-	1	1	-	-	1
	2	-	-	2	2	-	-	2	2	-	-	2
6.			(-)	3			-	3			-	3
	4	(-)			4	(+)			4	-		
			(+)	5			(+)	5			(-)	5
	1	-	-	1	1	+	-	1	1	(+)	-	1
	2	(+)	+	2	2	+	+	2	2	+	(-)	2
			+	3			+	3			(+)	3
	4	+			4	+			4	+		
			+	5			+	5			+	5

+ im Bereich der Norm, - nicht im Bereich der Norm

Tab.12: Tabellarischer Vergleich kollageninduzierter Plättchenaggregation im Born-Test (Born) und im Kollagen-Zentrifugiertest (KZT).

gestellten Ergebnisse stellt man eine erstaunliche Überein-

stimmung zwischen den mit zwei methodisch doch recht verschiedenen Tests erhaltenen Aussagen zur kollageninduzierten Plättchenaggregation fest. Eine derartige Übereinstimmung von Aggregationsmessungen durch den Kollagen-Zentrifugiertest mit Aggregationsmessungen im Born-Apparat hat sich immer wieder für »normale« und teilweise auch für ASS-geschädigte, jedoch nicht für primär pathologische Thrombozyten (vgl. Abb. 65a, c und Abb. 66, sowie Abb. 68b und Abb. 69a) gezeigt.

Die kollageninduzierte Plättchenaggregation mit Hilfe der SSKF als Aggregans sowohl nach der Born'schen Methode, als auch mit dem Kollagen-Zentrifugiertest aussagekräftig untersuchen zu können, kommt der erwähnten Konzeption von R. Marx entgegen, wonach die experimentelle Erfassung komplexen physiologischen Verhaltens weniger nach »dem« Test, als vielmehr nach nuancierten Aussagen unterschiedlicher, leistungsfähiger Tests verlangt.

4.5. Die kollageninduzierte Aggregation thrombopathifizierter Blutplättchen

Verhältnismässig breit ist in der vorliegenden Untersuchung, insbesondere am Beispiel der Azetylsalicylsäure, geprüft worden, wie sich mit Hilfe der kollageninduzierten Plättchenaggregation ein thrombopathifizierender Effekt erfassen lässt.

Nach zum Teil bereits länger zurückliegenden Beobachtungen verschiedener anderer Autoren, hat Quick 1966 mitgeteilt, dass zwei Stunden nach der Einnahme von 0,65g »Aspirin« die Blutungszeit gesunder Kontrollpersonen signifikant über die Werte vor der Azetylsalicylsäure-Einnahme steigt, dabei die obere Grenze des Normbereichs aber nicht überschreitet. Dagegen würden normale Blutungszeiten von Patienten mit einem

M.v.Willebrand-Jürgens nach der ASS-Einnahme pathologisch. Die Verlängerung der Blutungszeit nach Aspiringaben wurde von Weiss u. Aledort (1967) bestätigt. Bei der turbidimetrischen Untersuchung der Plättchenaggregation haben dann verschiedene Autoren übereinstimmend gefunden, dass ASS sowohl nach Ingestion als auch in vitro zugesetzt die "second wave" der adrenalin- und der ADP-induzierten Plättchenaggregation unterdrückt und die Induktion der letztgenannten Reaktion durch Kollagen abschwächt (2,33,94,123,130). Die eigenen Untersuchungsergebnisse stehen mit den vorgenannten in gutem Einklang (vgl.z.B. Abb.44). Der Einfluss von ASS auf die kollageninduzierte Plättchenaggregation im einzelnen scheint der einschlägigen Literatur zufolge wenig untersucht zu sein.

Die eigenen Versuche ASS-tangierte Thrombozyten mit Kollagen zu aggregieren, haben als besonderes Charakteristikum eine gut zu differenzierende Abhängigkeit des aggregationshemmenden Effektes von der Stärke des aggregatorischen Stimulus, d.h. von der Kollagendosierung, gezeigt. Diesen Zusammenhang deutet bereits O'Brien (1968b) an, wenn er seine zunächst getroffene Feststellung, die "collagen response" ASS-tangierter Plättchen sei völlig verändert, durch den Hinweis ergänzt, dass eine höhere Kollagendosis eine der Norm etwas näherkommende Reaktion erbrächte. Die Abhängigkeit des in vitro messbaren Aze-tylsalicylsäureeffektes von der Kollagendosierung zeigt sich im Kollagen-Zentrifugiertest ebenso wie in der Born'schen Untersuchungsmethode. Dabei verdeutlichen gerade mit der letztgenannten Methode gewonnene Aggregationskurven (z.B.Abb.56a,b und 58b) recht gut, dass zwar unter einer verfünf- oder verzenfachen Kollagendosis durch ASS thrombopathifizierte Plättchen im PRP noch zu beachtlicher Aggregation fähig sind, die

Qualität dieser Aggregation (zu erkennen am Aggregationsmaximum, -winkel, an der Aggregationsamplitude) jedoch auffallend verändert bleibt. Die Abhängigkeit der Aggregationshemmung von der ASS-Dosis ist im übrigen ebenfalls unter Verwendung von Kollagen gut zu demonstrieren (Abb.47).

Wie der Wirkungsgrad einer ASS-Gabe auf die Vollblut-Aggregation in einem Zusammenhang mit der aggregierenden ^{Kollagendosis} steht, ist im Kollagen-Zentrifugiertest an den charakteristischen »Kollagen-Belastungsprofilen« gleichsam auf den ersten Blick zu erkennen. Gerade diese Beziehung zwischen Kollagendosis (oder Kollagenbelastung) und ASS-Effekt ermöglicht es im Kollagen-Zentrifugiertest sowohl individuelle Unterschiede im Ansprechen von Blutplättchen auf gleiche Dosen des thrombopathifizierenden Giftes (Abb.53-55, 57a-c) auszumachen, als auch Schwankungen im Ansprechen der Thrombozyten des gleichen Individuums auf ASS etwa während einer Behandlungsphase mit »Colfarit« (Abb.57a,b) zu erkennen. Ein gewisses Schwanken des aggregationshemmenden Effektes der Azetylsalicylsäure auf die Plättchen entsprechend therapierter Patienten wird im Born-Apparat mit Hilfe von Kollagen als Aggregans in ähnlicher Weise deutlich (z.B. Abb.56a).

Von nicht geringer Bedeutung ist es zu wissen, wie lange der hemmende Einfluss einer ASS-Dosis auf die Plättchenaggregation anhält. O'Brien (1968a) hat hierzu das PRP von Probanden, die 0,5, 0,9, 1,2 und 2,1g »Aspirin« eingenommen hatten, mit Adrenalin aggregiert und gefunden, dass vor allem in Abhängigkeit vom Individuum und in geringerer Abhängigkeit von der ASS-Dosis die »second wave« ein bis fünf Tage und gelegentlich länger unterdrückt bleibt. Während andere Autoren das »releasing« von ADP aus ASS-tangierten Thrombozyten etwa sieben Tage ge-

hemmt finden (123), kann die Normalisierung eines zuvor als pathologisch erkannten PAT (Plättchenaggregationstest nach Breddin) durch einmalige ASS-Gaben von 1 bis 1,5g einen, zwei vier aber auch bis zu zehn Tage anhalten (17). Die eigenen mit dem Kollagen-Zentrifugiertest zu derselben Fragestellung erhobenen Befunde, weisen ebenfalls auf individuelle Unterschiede des Thrombozyteneffektes etwa von 1,5g ASS hin (vgl. Abb. 53-55). Dieser ist, in Abhängigkeit von der Kollagenbelastung der thrombopathifizierte Plättchen im Test, mindestens sechs und bis zu 16 Tage lang nachweisbar. In dem Zusammenhang sei nebenbei darauf hingewiesen, dass Thrombozyten mit dem Abklingen einer ASS-Wirkung möglicherweise verstärkt, d.h. in einer verkürzten Reaktionszeit an Kollagenfibrillen adhärieren (vgl. Abb. 51, 52).

Die Beobachtung, dass die Plättchenadhäsion an Kollagenfibrillen als solche durch Azetylsalicylsäure nicht gestört wird (145), lässt sich durch die mit Hilfe der Präparation sauer suspendierter Kollagenfibrillen (SSKF) gewonnenen eigenen Untersuchungsergebnisse bestätigen (s. a. Abb. 48). Da die adrenalin- wie die ADP-induzierte "first wave" durch ASS ebenfalls keine Hemmung erfährt, wird man erneut an die bereits diskutierte Parallelität zwischen "first waves" und Reaktions-, i.e. Adhäsionsphase, zwischen Thrombozyten und Kollagen erinnert.

Die grosse Empfindlichkeit mit der Blutplättchen auf eine u.U. auch einige Tage zurückliegende Einnahme selbst kleiner Mengen von Azetylsalicylsäure und anderen thrombopathifizierenden Giften, z.B. aus der Gruppe der Analgetika, Antipyretika und Entzündungshemmer, reagieren, lässt einer intensiven Medikamentenanamnese vor jeder Thrombozytenfunktions-testung allergrösste Bedeutung zukommen. Bei deren Erhebung

muss man gewärtig sein, von Patienten zu erfahren, sie hätten (azetylsalicylsäurehaltige) "Mittel" wie "Spalt-Tabletten", Ring-Tabletten, "Togal", Föhntabletten udgl. nicht in der Meinung gekauft, damit ein Medikament zu erwerben. Eine Liste, die die gängigsten azetylsalicylsäurehaltigen Präparate der Schweiz aufführt (9), enthält über 28 zum kleineren Teil reine ASS-Spezialitäten neben Kombinationen mit Vitaminen, Promethazin, Chinin, Coffein und Phenazetin. In England sollen pro Jahr zwei Milliarden Aspirintabletten verbraucht werden, d.h. pro Einwohner zwei Tabletten wöchentlich (68). O'Brien (1968a) gibt an von zehn Patienten mit einer Blutungsneigung hätten sich nach einer Befragung vier als "aspirin eater" herausgestellt und dieser Anteil sei nicht merklich höher als in einer entsprechenden Vergleichsgruppe von 141 Personen. Eine repräsentative Befragung von 2000 Bundesbürgern im Alter zwischen 16 und 70 Jahren ergab im November 1968 u.a., dass 28% in den letzten 14 Tagen ein Kopfschmerzmittel eingenommen hatten (1).

5. Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit hat in der Entwicklung einer Kollagenpräparation bestanden, die sich als Kollagenreagens für hämostaseologische Untersuchungen, insbesondere für die Thrombozytenfunktionsprüfung, gut eignen sollte. Die hierzu angestellten experimentellen Untersuchungen haben u.a. folgende wesentliche Ergebnisse gebracht:

1. Als besonders aktive und gut zu handhabende Kollagenpräparation hat sich für die Untersuchung der Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten die Entwicklung einer saueren Suspension kollagener Fibrillen (SSKF) aus equinen Achillessehnen erwiesen.
2. Unter Verwendung der SSKF lassen sich Thrombopathien und thrombopathifizierende Einflüsse differenziert und mit Hilfe verschiedener Untersuchungsmethoden gut nachweisen.
3. Die Verwendung eines geeigneten Kollagenreagens bietet für die Untersuchung von Thrombozytenfunktionen unbestreitbare Vorzüge, kann aber die adrenalin- und die ADP-induzierte Plättchenaggregation nicht ganz ersetzen.
4. Ein seit längerem bestehendes Konzept von R.Marx ist mit Hilfe der SSKF zu einem Kollagen-Zentrifugiertest ausgearbeitet worden.
5. Der entwickelte Kollagen-Zentrifugiertest ist vor allem für die klinische Routine zur Untersuchung der Thrombozytenaggregabilität im Vollblut gut geeignet.

6. Die Fähigkeit zur Plättchenaggregation scheint an die polymere Form des Kollagens gebunden zu sein.
7. Der plättchenaggregierende Effekt von Kollagen hängt u.a. vor allem vom Vernetzungsgrad der kollagenen Fibrillen, d.h. von der angebotenen kollagenen Oberfläche ab.
8. Eine geeignete Präparation vorausgesetzt, lassen sich μg -Mengen von Kollagen anhand ihrer biologischen Aktivität auf Blutplättchen sehr einfach nachweisen.
9. Neben dieser für ein Skleroprotein wohl bemerkenswerten biologischen Aktivität 3mg Kollagen in Form der SSKF reichen zur in vitro-Aggregation des Thrombozytenpools einer gesunden Kontrollperson aus- hat sich eine nicht weniger bemerkenswerte Beständigkeit trockenen Kollagens gegen Hitzeeinwirkung gezeigt.
10. Nebenbei ist die plättchenaggregierende Wirkung einer organischen Quecksilberverbindung (2-(äthyl-mercuri-mercaptopo)-benzoxazol-5-carbonsaures Natrium ("Cialit")) gefunden worden.

6. L i t e r a t u r

1. Allensbacher Berichte, November 1968: Der Tablettenkonsum
2. Al-Mondhiry, H., A.J. Marcus, T.H. Spaet (1970): On the mechanism of platelet function inhibition by acetylsalicylic acid, Proc.Soc.exp.Biol.(N.Y.) 133, 632
3. Ardlie, N.G., G.Glew, C.J.Schwartz (1966): Influence of catecholamines on nucleotide-induced platelet aggregation, Nature(London) 211, 415
4. Baele, G., P.Vanden Bogaert, F.Barbier (1971): Comparison of platelet aggregation in normal individuals and in uraemic patients with two different collagen preparations, Acta med.Scand.Suppl.525, 131
5. Balazs, E. ed. (1971): Chemistry and molecular biology of the intercellular matrix, Acad.Press, London
6. Bańkowski, E., S.Niewiarowski, W.Galasinski (1967): Platelet aggregation by human collagen in relation to its age, Gerontologia 13, 219
7. Bańkowski, E., S.Niewiarowski, W.Rogowski (1969): Decrease of platelet aggregating activity of soluble human collagen fractions during ageing, Thromb.Diath.Haemorrh.21, 441
8. Biggs, R., A.Sharp, J.Margolis, R.M.Hardisty, J.Stewart, W.M.Davidson (1958): Defects in the early stages of blood coagulation, a report of four cases. Brit.J. Haematol.4, 177
9. Blättler, W. (1973): Azetylsalicylsäure und Thromboseprophylaxe, Schweiz.Med.Wschr.103, 747
10. Bordet, J., O.Gengou (1903): Recherches sur la coagulation du sang, Ann.Inst.Pasteur 17, 822
11. Born, G.V.R. (1962): Quantitative investigations into the aggregation of blood platelets, J.Physiol.162, 67
12. Born, G.V.R., M.J.Cross (1963): The aggregation of blood platelets, J.Physiol.168, 178
13. Born, G.V.R., M.Hume (1967): Effects of the numbers and sizes of platelet aggregates on the optical density of plasma, Nature(Lond.)215, 1027
14. Born, G.V.R. (1971): Platelet aggregation in physiological systems, Acta Med.Scand.Suppl.525, 11
15. Bounameaux, Y. (1959): L'accolement des plaquettes aux fibres sous endothéliales, C.R.Soc.Biol.(Paris)153, 865

16. Bounameaux, Y. (1961): L'accolement des plaquettes aux fibres sous endothéliales, *Thromb.Diath.Haemorrh.* 6, 504
17. Breddin, K., I. Scharrer, M. Schepping (1970): Experimentelle Grundlagen zur Thrombozytenaggregationshemmung, in: Referate des Colfarit-Symposiums 1970 Köln
18. Breddin, K. (1973): Persönliche Mitteilung
19. Bridges, J.M., J.A. Weaver (1966): Platelet stickiness, *Amer.Heart J.* 71, 291
20. Brilla, G., E. Kuhnke (1960): Ein Verbesserungsvorschlag für die Praxis der Retraktionsmessung, *Blut* 6, 227
21. Caen, J.P., P.A. Castaldi, J.C. Leclerc, S. Inceman, M.J. Larrieu, M. Probst, J. Bernard (1966): Congenital bleeding disorders with long bleeding time and normal platelet count. I. Glanzmann's thrombasthenia (report of fifteen patients), *Amer.J.Med.* 41, 4
22. Caen, J.P., Y. Legrand, Y. Sultan (1970a): Platelet-collagen interactions, *Thromb.Diath.Haemorrh.Suppl.* 40, 181
23. Caen, J.P., H. Vainer, Y. Sultan, H. Lukasiewicz (1970b): Constitutional and acquired abnormalities of platelet aggregation, *Ser.Haemat.* 3, 83
24. Caen, J.P., Y. Legrand (1971a): Plaquettes, collagène et elastine, *Thromb.Diath.Haemorrh.Suppl.* 46, 167
25. Caen, J.P. (1971b): Diskussionsbemerkung, *Acta Med.Scand. Suppl.* 525, 61
26. Caen, J.P., Y. Sultan, H. Michel (1971c): Platelet disaggregation and the degradation of ADP in the plasma, *Acta Med.Scand.Suppl.* 525, 117
27. Caprino, L., F. Borrelli, R. Falchetti (1973): Effect of 4,5-diphenyl-2-bis(2-hydroxyethyl)aminoxazol (Ditazol) on platelet aggregation, adhesiveness and bleeding time, *Arzneim.Forsch.* 23, 1277
28. Chvapil, M., J. Hurych (1962): zit.n. 103., *Kozarstvi* 12, 293
29. Cronberg, S. (1971): A mathematical model for optical platelet aggregation test, *Acta Med.Scand.Suppl.* 525, 49
30. Day, H.J., H. Holmsen (1971): Concepts of the blood platelet release reaction, *Ser.Haematol.* 4, 3
31. De Gaetano, G., J. Vermylen, M. Verstraete (1971): A specific human immunoglobulin G preparation causing platelet clumping through a release reaction, *Acta Med.Scand.Suppl.* 525, 157

32. Eberth, J.C., C.Schimmelbusch (1886): Experimentelle Untersuchungen über Thrombose, Virch.Arch.path.Anat.103, 39
33. Evans, G., M.A.Packham, E.E.Nishizawa, J.F.Mustard E.A.Murphy (1968): The effect of acetylsalicylic acid on platelet function, J.exp.Med.128, 877
34. Farbiszewski, R. et al. (1968): Release of platelet factor 4 in vivo during intravascular coagulation and in thrombotic states, Thromb.Diath.Haemorrh.19, 578
35. Gaarder, A., J.Jonsen, S.Laland, A.J.Hellem P.A.Owren (1961): Adenosine diphosphate in red cells as a factor in the adhesiveness of human blood platelets, Nature(Lond.)192, 531
36. Grassmann, W. (1965): Kollagen, in: Fortsch.Chemie organ. Naturst.23, 196, Springer, Wien
37. Grette, K. (1962): Studies on the mechanism of thrombin-catalysed hemostatic reactions in blood platelets, Acta Physiol.Scand.56, Suppl.195, 5
38. Gross, R. (1971): Diskussionsbemerkung, Acta Med.Scand. Suppl.525, 61
39. Hardisty, R.M., R.A.Hutton (1966): Platelet aggregation and the availability of platelet factor 3, Brit.J. Haematol.12, 764
40. Hardisty, R.M., R.A.Hutton (1967): Bleeding tendency associated with a new abnormality of platelet behavior, Lancet I, 983
41. Harkness, M.L.R., R.D.Harkness, D.W.James (1958): The effect of a protein-free diet on the collagen content of mice, J.Physiol.144, 307
42. Harkness, R.D. (1961): Biological functions of collagen, Biol.Rev.36, 399
43. Heinrich, D., L.Róka (1969): Methode zur Bestimmung der Thrombozytenaggregation, Klin.Wschr.48, 235
44. Heinrich, D. (1972): Persönliche Mitteilung
45. Hellem, A.J., P.A.Owren (1964): The mechanism of the hemostatic function of blood platelets, Acta Haematol. (Basel) 31, 230
46. Holmsen, H., H.J.Day, H.Stormorken (1969): The blood platelet release reaction, Scand.J.Haemat.Suppl.8
47. Horowitz, H.J., J.M.Stein et al. (1970): Further studies on the platelet-inhibitory effect of guanidinocacetic acid and its role in uremic bleeding, Amer. J.Med.49, 336

48. Hovig, T. (1963a): Aggregation of rabbit blood platelets produced in vitro by saline "extract" of tendons, *Thromb.Diath.Haemorrh.*9, 248
49. Hovig, T. (1963b): Release of a platelet-aggregating substance (adenosine diphosphate) from rabbit blood platelets induced by saline "extract of tendons", *Thromb.Diath.Haemorrh.*9, 264
50. Hovig, T. (1965): The effect of various enzymes on the ultrastructure, aggregation and clot retraction ability of rabbit blood platelets, *Thromb.Diath.Haemorrh.*13, 84
51. Hovig, T., L.Jorgensen, M.A.Packham, J.F.Mustard (1968): Platelet adherence to fibrin and collagen, *J.Lab.Clin.Med.*71, 29
52. Hugues, J. (1960): Accolement des plaquettes aux collagène, *C.R.Soc.Biol.(Paris)* 154, 866
53. Hugues, J. (1962): Accolement des plaquettes aux structures conjonctives périvasculaires, *Thromb.Diath.Haemorrh.*8, 241
54. Hugues, J., C.M.Lapière (1964): Nouvelles recherches sur l'accolement des plaquettes aux fibres de collagène, *Thromb.Diath.Haemorrh.*11, 327
55. Hugues, J. (1968): Some remarks concerning platelet aggregation induced by collagen, *Exp.Biol.Med.*3, 145
56. Hugues, J. (1969): Plaquettes sanguines et structure du vaisseau, *Nouv.Rev.Franc.D'Hémat.*9, 529
57. Hugues, J. (1971): What does the optical platelet aggregation test actually measure? *Acta Med.Scand.Suppl.* 525, 41
58. Jackson, D.S. (1970): Biological function of collagen in the dermis, in: Montagna, W., *Dermis*, Appleton, N.Y.
59. Johnston, C.L., J.H.Ferguson, F.A.O'Hanlon (1958): Surface activation of plasma clotting. A function of Hageman factor, *Proc.Soc.exp.Biol.(N.Y.)*99, 197
60. Jürgens, R., H.Braunsteiner (1950): Zur Pathogenese der Thrombose, *Schweiz.Med.Wschr.*80, 388
61. Kaulla, K.N.v., D.Thilo (1970): Hemmung kollageninduzierter Aggregation menschlicher Thrombozyten durch Phenylderivate der 4-Amino-thiophen-3-carbonsäure, einer neuen Gruppe synthetischer Fibrinolytika, *Klin.Wschr.*49, 668
62. Kellermeyer, R.W., R.T.Breckenridge (1965): The inflammatory process in acute gouty arthritis. I. Activation of Hageman factor by sodium urate crystals, *J.Lab.Clin.Med.*65, 307

63. Kleszynski, R.R., J.W. Bastian (1971): A new method for quantitative platelet aggregation measurement in the whole blood, *Fed. Proc.* 30, 201 #bs
64. Knüchel, F., H. Ochs (1972): Serumtrübungsmessung. Zur semi-quantitativen Triglyceridbestimmung, *Med. Welt* 23, 1081
65. Kubisz, P., J. Suranova (1972): The effect of alpha- and beta-receptor blocking agents on collagen-induced platelet release reaction, *Thromb. Diath. Haemorrh.* 27, 278
66. Kühn, K. (1967): Untersuchungen zur Struktur des Kollagens, *Naturwissenschaften* 54, 101
67. Kutjanin, G.J. (1952): Heat stability of dried collagen, *Ber. Akad. Wiss. UdSSR* 82, 405
68. *Lancet* I (1972): Aspirin and blood donors, 477
69. Legrand, Y., J.P. Caen, L. Robert (1967): Collagènes purifiés et plaquettes sanguines, *Nouv. Rev. Franc. D'Hémat.* 7, 879
70. Legrand, Y., A. Huc (1971a): Abnormal collagen in scurvy and platelet aggregation, in: *Platelet aggregation*, ed. J.P. Caen, Masson & Cie., Paris
71. Legrand, Y., G. Pignaud (1971b): Some factors influencing the aggregating property of collagen, *Acta Med. Scand. Suppl.* 525, 127
72. Macmillan, D.C., M.R. Oliver (1965): The initial changes in platelet morphology following the addition of adenosine diphosphate, *J. Atheroscler. Res.* 5, 440
73. Macmillan, D.C. (1966): Secondary clumping effect in human citrated platelet-rich plasma produced by adenosine diphosphate and adrenaline, *Nature (Lond.)* 211, 140
74. Mammen, E. (1971) in: *Thrombosis and bleeding disorders*, ed. N.U. Bang et al., Thieme, Stgt.
75. Mannucci, P.M. (1971): Diskussionsbeitrag, *Acta Med. Scand. Suppl.* 525, 55
76. Margolis, J. (1962): Activation of Hageman factor by saturated fatty acids, *Austr. J. exp. Sci.* 40, 505
77. Margolis, J. (1963): The interrelationship of coagulation of plasma and release of peptides, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 104, 133
78. Marx, R. (1953): *Hämostaseologie*, Habilitationsschrift, München
78. Marx, R., S. Derlath (1957): Über eine Methode zur verglei-

chenden quantitativen Bestimmung der Thrombozyten-adhäsivität an blutfremden Oberflächen unter gleichzeitiger Erfassung der relativen Blutviskosität, Blut 3, 247

80. Marx, R. H. Murr (1971): Über physiologische Stimulatoren und potentielle Cofaktoren der Retraktion in thrombinhaltigen und thrombinaktivierten Testsystemen, Klin. Wschr. 49, 323
81. McLean, J. R., H. Veloso (1967): Change of shape without aggregation caused by ADP in rabbit platelets at low pH, Life Sci. Oxford 6, 1983
82. Michal, F. (1971): Light scattering and platelet aggregation, Acta Med. Scand. Suppl. 525, 45
83. Mustard, J. F., M. F. Glynn, E. E. Nishizawa, M. A. Packham (1967): Platelet-surface interactions: relationship to thrombosis and hemostasis, Fed. Proc. 26, 106
84. Neuman, R. E., M. A. Logan (1950): The determination of collagen and elastin in tissues, J. biol. Chem. 186, 549
85. Niewiarowski, S., E. Bańkowski, F. Fiedoruk (1964): Adsorption of Hageman factor (factor XII) on collagen, Experientia 20, 367
86. Niewiarowski, S., E. Bańkowski, J. Rogowicka (1965): Studies on the adsorption and activation of the Hageman factor (factor XII) by collagen and elastin, Thromb. Diath. Haemorrh. 14, 387
87. Niewiarowski, S., D. P. Thomas (1966): Platelet aggregation by ADP and thrombin, Nature (Lond.) 212, 1544
88. Nossel, H. L., G. D. Wilner, M. Drillings (1971): Inhibition of collagen-induced platelet aggregation by normal plasma, Fed. Proc. 30, 285 Abs
89. O'Brien, J. R. (1962): Platelet aggregation, part II, some results from a new method of study, J. clin. Path. 15, 452
90. O'Brien, J. R. (1963): Some effects of adrenaline and anti-adrenaline compounds on platelets in vitro and in vivo, Nature (Lond.) 200, 763
91. O'Brien, J. R. (1964): Variability in the aggregation of human platelets by adrenaline, Nature (Lond.) 202, 1188
92. O'Brien, J. R., J. B. Heywood, J. A. Heady (1966): The quantitation of platelet aggregation induced by four compounds: A study in relation to myocardial infarction, Thromb. Diath. Haemorrh. 16, 752
93. O'Brien, J. R. (1968a): Aspirin and platelet aggregation, Lancet I, 203

94. O'Brien, J.R. (1968b): Effects of salicylates on human platelets, *Lancet* I, 779
95. O'Brien, J.R. (1971): Factors influencing the optical platelet aggregation test, *Acta Med. Scand. Suppl.* 525, 43
96. Packham, M.A., E.S. Warrior, M.F. Glynn, A.S. Senyi, J.F. Mustard (1967): Alteration of the response of platelets to surface stimuli by pyrazole compounds, *J. Exp. Med.* 126, 171
97. Packham, M.A., M.A. Guccione, Puay-Lim Chang, J.F. Mustard (1973): Platelet aggregation and release: effects of low concentrations of thrombin or collagen, *Am. J. Physiol.* 225, 38
98. Pikkarainen, J., E. Kulonen (1969): Comparative chemistry of collagen, *Nature (Lond.)* 223, 839
99. Quick, A.J. (1966): Salicylates and bleeding, The aspirin tolerance test, *Amer. J. med. Sci.* 252, 265
100. Rabiner, S.F., F. Molinas (1970): The role of phenol and phenolic acids on the thrombocytopathy and defective platelet aggregation of patients with renal failure, *Amer. J. Med.* 49, 346
101. Ratnoff, O.D., J.M. Rosenblum (1958): Role of Hageman factor in the initiation of clotting by glass, *Amer. J. Med.* 25, 160
102. Ratnoff, O.D., J.D. Crum (1964): Activation of Hageman factor by solutions of ellagic acid, *J. Lab. clin. Med.* 63, 359
103. Reich, G. (1966): *Kollagen*, Steinkopff, Dresden
104. Roschlay, W.H.E., R. Gage (1972): The effects of Brinolase of platelet aggregation of dog and man, *Thromb. Diath. Haemorrh.* 28, 31
105. Rudall, K.M. (1955): The distribution of collagen and chitin, *Symp. Soc. exp. Biol.* 9, 49
106. Saides, A.L. (1950): The influence of the heating on the structure and properties of proteins, *Kolloid. J. UdSSR* 12, 347
107. Salzman, E.W., L. Levine (1971): Cyclic 3',5'-adenosine monophosphat in human blood platelets, *J. clin. Invest.* 50, 131
108. Schulte, W. (1939): *Ndlde. Pate.* 46.035, 46.554
DRP 817.388
Engle. Pate. 487.258, 487.660
U.S. Pat. 2.202.566
109. Schweighart, E. (1957): Studien über Thrombozytenagglutination und Thrombozytenagglutinations-Tendenz, *In-*

augural Dissertation, München

110. Seidel, W. (1966): Die Gliederung von Dissertationen und wissenschaftlichen Arbeiten, Münch. Med. Wschr. 108, 2244
111. Soulier, J.P., O. Prou-Wartelle (1960): New data on Hageman factor and plasma thromboplastin antecedent: the role of "contact" in the initial phase of blood coagulation, Brit. J. Haematol. 6, 88
112. Spaet, T.H., M.B. Zucker (1964): Mechanism of platelet plug formation and role of adenosine diphosphate, Amer. J. Physiol. 206, 1267
113. Spaet, T.H., J. Cintron (1965): Studies of platelet factor 3 availability, Brit. J. Haematol. 11, 269
114. Spaet, T.H., R.B. Erichson (1966): The vascular wall in the pathogenesis of thrombosis, in: Pathogenesis and treatment of thromboembolic diseases, Schattauer, Stgt.
115. Spaet, T.H., J. Lejnieks (1970): Unveröffentlichte Beobachtung
116. Tangun, Y., J.P. Caen (1965): Adhésion et agrégation plaquettaire au tissu conjonctif du mésentère du rat, Nouv. Rev. Franc. D'Hemat. 5, 79
117. Thomas, D.P. (1968): The role of platelet catecholamines in the aggregation of platelets by collagen and thrombin, Exp. Biol. Med. 3, 129
118. Vermylen, J., G. de Gaetano, M. Verstraete ed. (1971): Round-the-Table Conference on normal and modified platelet aggregation, Acta Med. Scand. Suppl. 525
119. Waaler, B.A. (1959): Contact activation in the intrinsic blood clotting system, University Press, Oslo
120. Weinzierl, M. (1963): Solufibrin, Inaugural Dissertation, München
121. Weiss, H.J. (1967)^a: Platelet aggregation, adhesion and adenosine diphosphate release in thrombopathia (platelet factor 3 deficiency), Amer. J. Med. 43, 570
122. Weiss, H.J., L.M. Aledort (1967b): Impaired platelet connective tissue reaction in man after aspirin ingestion, Lancet II, 495
123. Weiss, H.J., L.M. Aledort, S. Kochwa (1968): The effect of salicylates on the hemostatic properties of platelets in man, J. clin. Invest. 47, 2169
124. Wilner, G.D., H.L. Nossel, E.C. Le Roy (1968a): Activation of Hageman factor by collagen, J. clin. Invest. 47, 2608

125. Wilner, G.D., H.L. Nessel, E.C. Le Roy (1968b): Aggregation of platelets by collagen, *J. clin. Invest.* 47, 2616
126. Wojtecka-Lukasik, E., J. Sopata, J. Wize, M. Skonieczna, I. Niedzwiecka-Namyslowska, E. Kowalski (1967): Adhesion of platelets to collagen devoid of telopeptides, *Thromb. Diath. Haemorrh.* 18, 76
127. Zucker, M.B., J. Borelli (1959): Viscous metamorphosis, clot retraction and other morphologic alterations of blood platelets, *J. appl. Physiol.* 14, 575
128. Zucker, M.B., J. Borelli (1962): Platelet clumping produced by connective tissue suspensions and by collagen, *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* 109, 779
129. Zucker, M.B., J. Peterson (1968): Inhibition of adenosine diphosphate-induced secondary aggregation and other platelet functions by acetylsalicylic acid ingestion, *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* 127, 547

Herrn Professor Dr.H.Schwiegk danke ich für die Übernahme des Coreferates.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr.R.Marx nicht nur dafür, dass er die vorliegende Arbeit initiiert und mir dafür einen Arbeitsplatz zur Verfügung gestellt hat, sondern auch für wertvolle Hilfen und die unerschöpfliche Fülle von Anregungen. Des weiteren danke ich Frau A.Meisner, Fräulein Dr.H.Murr, allen Mitarbeitern des hämostaseologischen Labors der I.Medizinischen Klinik sowie zahlreichen "gesunden Kontrollpersonen" für die vielfache Unterstützung, wichtige Diskussionen und die entgegenkommende Hilfsbereitschaft.

Nicht zuletzt seien auch meine Förderung während der Durchführung des experimentellen Teils dieser Arbeit (Februar 1970 - Oktober 1971) durch ein Promotionsstipendium aus Mitteln des Freistaates Bayern und die Zuwendung von Sachmitteln aus dem SFB 51 dankbar vermerkt.

Lebenslauf

Am 27.11.1942 wurde ich als Sohn des Dipl.Ing. Friedrich Wilhelm Schulte und seiner Ehefrau Wilhelmine, geb.Diekmann, in Meppel (Niederlande) geboren. Das Ende des Zweiten Weltkriegs erlebten meine Mutter und ich in Jemgum in Ostfriesland und mein Vater im Volkssturm. Nach der Rückkehr des Vaters aus der Kriegsgefangenschaft gelangten wir über Nastätten im Taunus nach Neustadt an der Donau, um dort 1951 ansässig zu werden. Meine Schulzeit beendete ich 1963 am humanistischen Gymnasium in Neuburg an der Donau.

Im Wintersemester 1963/64 begann für mich das Medizinstudium an der Universität München, das ich ebendort im Dezember 1969 mit dem Staatsexamen abschloss. Diese Zeit erfuhr im August 1967 eine besondere Bereicherung durch meine Heirat mit Fräulein Annekathrin Ganns. 1970 bin ich mit meiner Familie nach Freising gezogen. Im gleichen Jahr wurde unser erstes Kind, Manuel, geboren und 1972 unsere verstorbene Tochter Binnie.

